

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

Estudio del papel inmunomodulador de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vega Zamora de la Fuente

Directora

María Carmen Cuéllar del Hoyo

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

**Estudio del papel inmunomodulador de los antígenos
larvarios de *Anisakis simplex***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vega Zamora de la Fuente

DIRECTORA

Dra. María del Carmen Cuéllar del Hoyo

Madrid, 2017

Imagen de Portada Exterior: extraída de www.cell.com (Pinterest)



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología

María del Carmen Cuéllar del Hoyo, Doctora en Farmacia y Catedrática de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que Vega Zamora de la Fuente, Licenciada en Farmacia y Máster en Investigación en Inmunología, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado “ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex*” para optar al Grado de Doctor de la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid,.....de.....de 2017

Profa. Dra. María del Carmen Cuéllar del Hoyo

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos, y el horizonte se desplaza diez pasos más allá. Entonces, ¿para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar”.

Eduardo Galeano

“Lo hermoso del desierto es que en cualquier parte esconde un pozo”

Antoine de Saint-Exupéry,
El Principito

A mi familia,
A Téo y Fernando,
a Chapi,
y a todos los que a lo largo del camino siempre me tendisteis
una mano para ayudarme a levantarme en cada tropiezo.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a:

Fundación Ramón Areces

Fundación para el fomento de la investigación Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).

Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

No sé cómo empezar. Son muchas las personas gracias a las cuales este trabajo se ha hecho realidad, al fin. Ha sido un camino largo, en muchas ocasiones cuesta arriba, pero siempre bien acompañada, y en el que todos habéis puesto vuestro granito de arena.

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de tesis, Carmen Cuéllar, el haber confiado siempre en mí. En darme la oportunidad de aprender a pensar por mí misma y confiar en mis decisiones. Me has enseñado que de los errores es de lo que más se aprende, a ser más paciente y frustrarme menos cuando las cosas no salen como nos gustaría. Y sobre todo, gracias por tu sinceridad y mantener el buen humor en los días malos.

Por supuesto, quisiera extender mi agradecimiento a todas las personas del Departamento de Parasitología. Aún recuerdo aquella tarde de verano en la que me aventuré por primera vez por el Departamento y llamé nerviosa a la puerta del despacho de Paco Bolás para pedirle solicitar una Beca de Colaboración. No sabía que ese día comenzaría una aventura que me llevaría a escribir estas líneas seis años después. Gracias, porque fuiste tú el primero que me ofreció una oportunidad, y creyó en mí. Gracias a ti conseguí esa Beca y pude conocer el mundo de la investigación, de los parásitos y de la inmunología. Y, además, pude conocer a Juan García. A él le debo el haber decidido hacer el Doctorado. Desde el primer momento me contagió su pasión por la investigación, su amor por la ciencia. Así que gracias a los dos, porque sin vosotros hoy no estaría aquí.

Y me quedé. Entre todos hicisteis que me sintiera como en casa. Gracias a Paco Ponce por hacerme reír y hacer crecer mi capacidad y velocidad para coger chistes (aún así me queda mucho por aprender); a Mercedes y a Catina, por su inmenso cariño, por las largas conversaciones acompañadas de chuches; a Juanjo Nogal y Alicia, porque siempre teneis un buen consejo guardado bajo la manga, por trasmitirme paz y serenidad; gracias a Jose Antonio Escario, claramente hacer el doctorado sin tu sentido del humor no habría sido lo mismo; a Maruxi por hacer que las noches y los fines de semana en el laboratorio no fueran tan solitarios.

A Javier, Inés y Manoli, por enseñarme tantas cosas, por estar siempre dispuestos a echarme una mano con lo que fuera cuando fuera, por hacer del Departamento un lugar mucho más acogedor y divertido. Gracias a Judith por su infinita energía, porque cualquier cosa es posible si ella se lo propone. Visto y no visto.

Y claro está, a mis compañeros de laboratorio, Vir y Juan. Por convertirnos en buenos amigos, en confidentes. Por nuestros “a tope”; porque las mañanas habrían sido mucho más largas sin la radio puesta a todo volumen; por las horas y horas que hemos pasado codo con codo, sumergidos en el congelador en busca de sueros, peleándonos con el peachímetro o lavando placas y placas, acabando empapados de PBS-Tween. Juntos. Gracias por enseñarme tanto. Y a Laura Ullate, que aunque llegué cuando ya casi no

estabas, cómo agradecí siempre tus apariciones a las seis de la tarde. Nuestras conversaciones. Eres simplemente genial.

No podría olvidarme de mis dos “hermanas mayores”, Sandra y Cristina. Con el paso del tiempo os fuisteis convirtiendo en muy buenas amigas y en un ejemplo a seguir. No sé qué habría hecho sin vosotras. Gracias por creer en mí, por estar siempre ahí. Gracias por compartir sudor y lágrimas, pero también muchas, muchas carcajadas. Y Yane... mi otra “hermana mayor”, por alegrarme los días. Por tus bailes y tus abrazos. Tu presencia lo hacía todo mejor. Cuánto te echamos de menos.

A Pablo, mi primer compañero de laboratorio, el que a pesar de los esfuerzos no consiguió que mi relación con los ratones mejorara. Gracias por ayudarme a centrarme y aprender a no ser tan dispersa, a ver las cosas desde sus distintos ángulos.

Y a Bea, por tu fuerza infinita, tu persistencia. Porque aunque por dentro te sintieras agotada, ahí seguías, erre que erre, a por todas. Y esas ganas, nos las trasmitías a los demás. Gracias Beichu.

En definitiva, gracias a todos, por enseñarme tanto y dejarme formar parte de vuestra gran familia estos últimos años.

Por supuesto, gracias a Juan Carlos Andreu-Ballester del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia. Sin él gran parte de esta tesis no habría llegado a puerto. He tenido la suerte de, aunque en la distancia, trabajar contigo y aprender de ti.

También debo mucho, muchísimo, al equipo del Centro de Citometría y Microscopía de la Complutense. En especial, a Amalia. Por recibirme siempre con una sonrisa, por animarme y ayudarme con los baches que fueron surgiendo. Contigo di mis primeros pasos en el mundo de la citometría, a veces tan confuso, y no solo le perdí el miedo, sino que me terminó encantando.

Gracias a Beatriz de las Heras Polo, por darnos su apoyo y echarnos una mano cuando lo necesitamos. A Carlos Guillén Viejo, por ser fuente de sabiduría y estar siempre dispuesto a ayudar, y sobre todo, por su calidad humana.

Y en fin, gracias a Alba, Ana, Marisa, Laura, Pili y Leti. Por estar siempre ahí, por ser mis mejores amigas. Por no enfadarse cuando no pude dedicarlas todo el tiempo que las hubiera gustado, por no dejarme tirar la toalla, por devolverme las ganas y la ilusión cuando las había perdido.

Gracias a todos mis amigos, a los del cole, a los de la uni, a los del pueblo... no puedo nombraros a todos, pero vosotros sabéis quiénes sois. Gracias por no dejar que me encerrara en casa a escribir y escribir, y sacarme de la “madriguera” de vez en cuando para que no me volviera loca. Y en especial, a mis resis mayores, y mis resis pequeños; a Palmi, Mario, María Azañedo, María “inmuno” y Laura Llorca, llegasteis al final de esta etapa pero habeis sido puro oxígeno en la recta final. Y gracias a mi Co-R, María, por ser mi bomba de escape, día a día, por cuidarme y enseñarme a quererme.

Gracias a Varete, por hacerme ver las cosas a baja velocidad, a apreciar los detalles, por ser mi amigo. Gracias por darle a esta Tesis parte de tu arte y hacerla más bonita. A Guille, por apoyarme siempre y aportarme la cordura que me falta. Y gracias a Víctor Andrés, porque desde que te conocí has sido mi catalizador para enfrentarme a lo nuevo y a lo desconocido.

Sin embargo, no puedo terminar sin dar las gracias a mi familia.

A los “Chapi”: María, Jorge, Aurora y Fermín, por hacerme sentir parte de su pequeña tribu. Por cuidarme y animarme, por los buenos momentos acompañados de ricas paellas.

A mi madre por animarme y aguantar mi mal humor, por su eterna paciencia, y porque la admiro. Ojalá algún día llegue a ser tan valiente como lo eres tú todos los días. A mi hermana, porque aunque no siempre nos hayamos llevado bien, poco a poco nos vamos reencontrando. Porque siempre he envidiado tu capacidad para enfrentarte a los leones, a pesar de estar muerta de miedo. A mi padre, porque esta Tesis es tan mía como tuya. Gracias papá por pegarme tu amor por la ciencia, por tus ansias por descubrir, conocer, aprender. Gracias a los tres. Y gracias a Tuca, porque ha sido mi compañera incansable durante el FIR y el Doctorado, por limar mi mal humor al llegar a casa.

Por último, gracias a ti, Chapi. Has sido el mayor apoyo de todos. Las palabras se me quedan cortas para expresar lo muchísimo que me has ayudado, lo que has supuesto y lo que significas. No sólo en este proyecto, sino en todo.

Gracias a todos. Esta Tesis lleva un poquito de todos vosotros.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| AECOSAN | Agencia Española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición |
| AGA | Anisakidosis gastroalérgica |
| APACHE | <i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i> |
| APC | Célula presentadora de Antígeno |
| APS | Persulfato amónico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BMDDCs | <i>Bone Marrow Derived Dendritic Cells</i> |
| B _{reg} | Linfocitos B reguladores |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| CD | Célula Dendrítica |
| cCD | Célula dendrítica clásica |
| CE | Antígeno Total/ Extracto Crudo de <i>A. simplex</i> |
| CLR | C-type lectin receptors |
| CMF | Citometría de Flujo |
| CXCR5 | <i>CXC chemokine receptor 5</i> |
| D.O. | Densidad Óptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| EC | Enfermedad de Crohn |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EFSA | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria |
| EGTA | Ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| ES | Antígeno excretor-secretor de <i>A. simplex</i> |
| ESR | Tiempo de sedimentación eritrocitaria |
| FCS | <i>Forward Scatter</i> . Dispersión de luz frontal |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| HRP | <i>Horse Radish Peroxidasa</i> |

| | |
|-------------------|---|
| IFN- γ | Interferón γ |
| IGF-1 | <i>insulin-like growth factor</i> |
| IL-10 | Citocina 10 |
| IL-12 | Citocina 12 |
| KGF-1 y KGF-2 | <i>keratinocyte growth factor</i> 1 y 2 |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LT $\alpha\beta$ | Linfocitos T $\alpha\beta$ |
| LT $\gamma\delta$ | Linfocitos T $\gamma\delta$ |
| L1 | Larva de primer estadio de <i>A. simplex</i> |
| L2 | Larva de segundo estadio de <i>A. simplex</i> |
| L3 | Larva de tercer estadio de <i>A. simplex</i> |
| L4 | Larva de cuarto estadio de <i>A. simplex</i> |
| MHC | Complejo Principal de Histocompatibilidad |
| MIF | <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> |
| MTT | 3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio |
| NK | <i>Natural Killers</i> |
| NKT | Linfocitos T Natural Killers |
| NMS | Suero Normal Murino |
| nT _{reg} | Células T reguladoras naturales |
| PAMP | Patrón Molecular Asociado a Patógenos |
| PBE | <i>Phosphate Buffered EDTA</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| pCD | Células dendríticas plasmacitoides |
| PCR | Proteína C Reactiva |
| PTB | PBS 1X-Tween 20 |
| RPMI | Medio Roswell Park Memorial Institute |
| RRP | Receptor de Reconocimiento de Patrones |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SOFA | <i>Sequential Organ Failure Assesment</i> |
| SSC | <i>Side Scatter</i> . Dispersión de luz lateral |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |

| | |
|---------------|---|
| TGF- β | Factor de crecimiento trasformante |
| TLR | <i>Toll Like Receptor</i> |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral (Interferon α) |
| UC | Urticaria Crónica |
| UC+ | Urticaria Crónica por sensibilización a <i>A. simplex</i> |
| WINMDI | <i>Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry</i> |

ÍNDICE

ÍNDICE

| | | |
|-------------|---|---------------|
| | ABREVIATURAS..... | 15 |
| I. | SUMMARY..... | 25-30 |
| II. | RESUMEN..... | 31-36 |
| III. | INTRODUCCIÓN..... | 37-92 |
| 1. | Características de <i>Anisakis</i> spp. | 40 |
| 1.1. | Taxonomía..... | 40 |
| 1.2. | Características morfológicas..... | 41 |
| 1.3. | Ciclo biológico de <i>Anisakis</i> | 42 |
| 1.4. | Distribución geográfica..... | 44 |
| 1.5. | Hospedadores..... | 45 |
| 2. | <i>Anisakidosis</i> | 49 |
| 2.1. | Tipos de anisakidosis..... | 50 |
| 2.2. | Anisakidosis y alergia..... | 55 |
| 2.3. | Diagnóstico de la anisakidosis..... | 63 |
| 2.4. | Tratamiento de la anisakidosis..... | 65 |
| 2.5. | Prevención de la anisakidosis..... | 65 |
| 3. | <i>Anisakis simplex</i> e inmunomodulación..... | 66 |
| 3.1. | Inmunopatología..... | 67 |
| 3.2. | Linfocitos T..... | 71 |
| 3.3. | Linfocitos B reguladores..... | 80 |
| 3.4. | Células dendríticas..... | 80 |
| 4. | Helminthos e inmunomodulación..... | 83 |
| 4.1. | Hipótesis de la higiene..... | 85 |
| 4.2. | <i>Toll-like receptors</i> (TLR)..... | 88 |
| IV. | OBJETIVOS..... | 93-96 |
| 1. | Objetivos generales..... | 95 |
| 2. | Objetivos concretos..... | 96 |
| V. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 97-144 |
| 1. | Materiales..... | 99 |
| 1.1. | Material de laboratorio..... | 99 |
| 1.2. | Material biológico..... | 101 |
| 1.3. | Medios de cultivo..... | 103 |
| 1.4. | Soluciones, tampones, colorantes y reactivos generales..... | 104 |
| 1.5. | Tampones y reactivos para citometría de flujo..... | 106 |
| 1.6. | Tampones, soluciones y reactivos para ELISA..... | 107 |
| 1.7. | Antígenos ensayados | 109 |
| 1.8. | Programas informáticos y estadísticos..... | 111 |

| | | |
|------------|---|----------------|
| 2. | Métodos..... | 112 |
| 2.1. | Obtención de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> | 113 |
| 2.2. | Métodos empleados sobre células de ratones BALB/c y C57BL/6... | 115 |
| 2.2.1. | Obtención y cultivo de células murinas..... | 115 |
| | A) Obtención y cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDDCs)..... | 115 |
| | B) Obtención y cultivo de linfocitos vírgenes extraídos de bazo de ratón..... | 117 |
| 2.2.2. | Estimulación y caracterización de células murinas..... | 118 |
| | A) Estudio de los efectos producidos por los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre distintos marcadores celulares en BMDDCs..... | 118 |
| | B) Estudio de los efectos producidos por los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre distintos marcadores celulares en linfocitos vírgenes extraídos de bazo de ratón..... | 128 |
| 2.3. | Métodos empleados en muestras humanas..... | 135 |
| 2.3.1. | Estudio de los niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> en suero de pacientes sanos y su relación con células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ | 135 |
| 2.3.2. | Estudio de los niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> en suero de pacientes con sepsis..... | 141 |
| VI. | RESULTADOS..... | 145-360 |
| 1. | ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE <i>Anisakis simplex</i> SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN..... | 146 |
| 1.1. | Efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón de la cepa BALB/c a día 6 de maduración..... | 147 |
| 1.2. | Efecto sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón procedentes de la cepa BALB/c a día 9 de maduración..... | 160 |
| 1.3. | Efecto sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón en la cepa C57BL/6 a día 6 de maduración..... | 169 |
| 1.4. | Efecto sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón de la cepa C57BL/6 a día 9 de maduración..... | 181 |
| 2. | EFECTO DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE <i>Anisakis simplex</i> SOBRE LA SEÑALIZACIÓN CELULAR DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES BALB/C Y C57BL/6..... | 191 |
| 2.1. | Efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la señalización celular en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c..... | 192 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 2.2. | Efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la señalización celular en células dendríticas de médula ósea de ratones C57BL/6..... | 246 |
| 3. | EFFECTO DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE <i>Anisakis simplex</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN..... | 286 |
| 3.1. | Estudio del efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c..... | 286 |
| 3.2. | Estudio del efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6..... | 294 |
| 3.3. | Estudio del efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón: comparación de los resultados obtenidos en las cepas de ratón BALB/c y C57BL/6..... | 301 |
| 4. | ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS CON LOS PRODUCTOS LARVARIOS DE <i>Anisakis simplex</i> PARA GENERAR LINFOCITOS T REGULADORES EN RATONES BALB/c y C57BL/6..... | 308 |
| 4.1. | Estudio de la capacidad de las células dendríticas estimuladas con los productos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> para generar linfocitos T reguladores en ratones BALB/c..... | 308 |
| 4.2. | Estudio de la capacidad de las células dendríticas estimuladas con los productos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> para generar linfocitos T reguladores en ratones C57BL/6..... | 316 |
| 5. | ESTUDIO DEL EFECTO in vitro DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS <i>Anisakis simplex</i> SOBRE LA CAPACIDAD LINFOPROLIFERATIVA DE ESLENOCITOS VÍRGENES EXTRAÍDOS DE BAZO DE RATONES BALB/c Y C57BL/6..... | 325 |
| 5.1. | Estandarización del método fluorimétrico empleando resazurina para determinar in vitro el efecto de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la capacidad linfoproliferativa de esplenocitos vírgenes extraídos de bazo de ratón..... | 325 |
| 5.2. | Estudio de la capacidad linfoproliferativa de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> : ensayo de linfoproliferación empleando resazurina..... | 327 |
| 5.2.1. | Efectos de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la capacidad proliferativas de esplenocitos extraídos de bazo de ratones BALB/c..... | 327 |
| 5.2.2. | Efectos de los antígenos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la capacidad proliferativas de esplenocitos extraídos de bazo de ratones C57BL/6..... | 335 |

| | | |
|-------|--|---------|
| 6. | ANTICUERPOS ANTI- <i>Anisakis simplex</i> EN SUERO DE INDIVIDUOS SANOS: SU RELACIÓN CON CÉLULAS T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ | 346 |
| 6.1. | Población de estudio..... | 346 |
| 6.2. | Niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> | 346 |
| 6.3. | Correlación de linfocitos T $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ y B con los niveles de anticuerpos específicos anti- <i>Anisakis simplex</i> | 347 |
| 6.4. | Niveles positivos de anticuerpos frente <i>Anisakis simplex</i> y linfocitos T..... | 348 |
| 7. | ANTICUERPOS ANTI- <i>Anisakis simplex</i> EN SUERO DE PACIENTES CON SEPSIS..... | 349 |
| 7.1. | Niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> según la severidad del cuadro séptico..... | 351 |
| 7.2. | Correlación entre los niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> con los subtipos de linfocitos T y los marcadores de severidad..... | 352 |
| 7.3. | Déficit de linfocitos T y anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> en pacientes sépticos..... | 354 |
| 7.4. | Relación entre los días de evolución del cuadro séptico con los niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> y los linfocitos T..... | 357 |
| 7.5. | Relación entre los niveles de anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> y los cultivos positivos de fluidos biológicos..... | 358 |
| 7.6. | Relación entre el descenso en los niveles de los distintos subtipos de células T y la mortalidad por sepsis..... | 359 |
| VII. | DISCUSIÓN | 361-386 |
| 1. | Efecto de los productos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la maduración y diferenciación de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón CD11c+..... | 363 |
| 2. | Efectos de los productos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la diferenciación de esplenocitos en presencia de CDs previamente estimuladas con ES y CE..... | 376 |
| 3. | Efecto de los productos larvarios de <i>Anisakis simplex</i> sobre la proliferación de esplenocitos de ratón..... | 379 |
| 4. | Anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> en suero de individuos sanos: su relación con células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ | 380 |
| 5. | Anticuerpos anti- <i>Anisakis simplex</i> en suero de pacientes con sepsis..... | 383 |
| VIII. | CONCLUSIONES | 387-392 |
| IX. | BIBLIOGRAFÍA | 393-422 |
| X. | LISTADO DE FIGURAS | 423-442 |
| XI. | LISTADO DE TABLAS | 443-456 |
| XII. | ANEXOS | 457-465 |

I. SUMMARY

SUMMARY

STUDY OF THE IMMUNOMODULATORY ROLE OF THE LARVAE ANTIGENS OF *Anisakis simplex*

Anisakidosis (infection caused by anisakids, especially *Anisakis simplex*), is a cosmopolitan parasitosis, with high prevalence in those countries where eating habits include frequent consumption of raw or little cooked fish, like Japan, Spain, Scandinavian countries, Peru or Chile. Nowadays, is one of the nematodoses more prevalent in Spain. Previous studies have shown that anisakidosis seroprevalence is very variable among different Spanish regions, with rates that oscillate between 0,43% in Galicia, and 15,7% and 22,1% in inland and southern regions, respectively. Third stage larvae (L3) parasitisation can lead to different clinical profiles, with acute or chronic symptoms, or just not symptomatology at all. Anyway, all these symptoms are related with L3 invasion of the gastrointestinal mucosa by the mechanical rupture of the tissues and the secretion of potent proteolytic enzymes able to degrade the extracellular matrix. During this process, several mechanisms to modulate the dichotomy of the host immune response are developed by *A. simplex* larvae for their own benefit. Their anticoagulant actions or their capacity to inhibit nitric oxide production by macrophages, exemplify two mechanisms.

On the other hand, Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells with an extraordinary capacity for stimulating *naïve* T cells and for initiating immunological responses. DCs are also important in self-tolerance. Their capacity for modulating T cells responses is essential for the discrimination between self-antigens and not self-antigens associated to mucosae. This is why DCs are considered the main key in the regulation of immunological responses, as well as the connection between innate and adaptive responses. Besides, DCs are abundant in intestinal mucosa (*lamina propria*), and due to the localisation of *A. simplex* larvae on the intestinal anisakidosis, larvae antigens could be placed directly on the *lamina propria* and captured by local DCs. Then, antigens could be transported through lymphatic vessels and presented to T cells in lymph nodes by DCs. Depending on the degree of DCs activation and the different kind of secreted cytokines, *naïve* T cells will be differentiated into Th1, Th2, Th17 or regulatory T (T_{reg}) lymphocytes. T_{reg} are a subpopulation specialised on suppressing the activation of the immunological system, modulating homeostasis and self-tolerance.

Interest in T_{reg} has been increased by the evidence found in murine experimental models that demonstrate the immunosuppressive potential of these cells can be therapeutically manipulated for the treatment of autoimmune diseases, facilitate tolerance to transplants or be specifically eliminated to enhance immunotherapy against cancer. In murine models, the presence of CD4 + CD25 + T_{reg} has been shown to play an important role in the intestinal mucosa by suppressing immunological responses to intestinal flora, as well as to pathogenic agents.

On the other hand, the study of the mechanisms by which parasites manipulate the immune response through anti-inflammatory molecules is of interest not only for the direct application on the development of antihelminthic strategies, but also for the development of new anti-inflammatory products for patients suffering from

inflammatory, autoimmune or allergic diseases. It is suspected that the high prevalence of atopy, allergic and autoimmune diseases in the Western world is related to the low levels of helminth infections rather than to genetic factors. For example, the beneficial effects of *Trichuris suis* on inflammatory bowel disease or the preventive effects of *Schistosoma mansoni*, *Heligmosomoides polygirus* and *Trichinella spiralis* on type 1 diabetes have been demonstrated.

Immune system cells recognize pathogens through special patterns through cell surface receptors. These receptors, called Toll-like receptors (TLRs), are responsible for the intracellular signaling of immune cells, leading to an activation of nuclear factor NF- κ B, and so the synthesis of proinflammatory cytokines. As the rest of pathogens, helminths also can have direct effects on innate immune responses through these receptors. *S. mansoni* expresses and secretes glycosylated molecules which bind to the C-selectin type receptors and antagonize a TLR-mediated pro-inflammatory pathway, for example. It has also been shown that chronic immune activation associated with helminthic intestinal infections result in incorrect transduction and anergy signals, and some transcription factors have been proposed as therapeutic signals. In addition, over-expression of some transcription factors has been described in tolerogenic DCs, so it is interesting to detect possible changes in signaling associated with tolerogenic Th1 or Th2 responses.

Thus, the study of immunomodulatory substances derived from parasites may explain why helminthic active infections reduce the efficacy of conventional vaccines and promote susceptibility to HIV, malaria or tuberculosis infections through the generation of T_{reg} which could act locally or systemically. Likewise, knowledge of the mechanisms by which parasites manipulate the immune response is of particular interest, not only for its direct application to the improvement of antihelminthic strategies, but also for the development of new anti-inflammatory therapies.

The main objective of this work is to investigate if *A. simplex* larval antigens present immunomodulatory properties by the induction of tolerogenic DCs capable of inducing Treg expansion. In this sense, the objectives of this Doctoral Thesis can be divided into two distinct parts: studies carried out *in vitro* in murine models and, on the other hand, studies carried out in humans.

In studies carried out in murine models, the effects of *A. simplex* larval antigens on the function and phenotype of DCs and T cells were studied when initiating a tolerogenic response for both strains of mice.

On the other hand, in the human studies, although the experimental hypothesis was based on that the larva products of *A. simplex* could act like mediators of immunosuppression, in this case we determined its direct interaction with the DCs of the intestinal mucosa and its relation to the production of tolerogenic signals capable of inducing changes in $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells (LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$) subpopulations. In addition, the immunosuppressive role of sepsis was also studied. It has been shown that immunosuppression caused by sepsis can increase host susceptibility to opportunistic secondary infections or to reactivate latent infections. Therefore, the potential immunosuppressive role of *A. simplex* larval antigens could lead to a decrease in LT $\gamma\delta$

populations after previous contact with the parasite. Overall, the levels of anti-*A. simplex* antibodies were determined in healthy individuals and septic patients, as well as their relationship with the different populations of T and B cells.

Therefore, the first part of this work focuses on the effect of *A. simplex* larval antigens on bone marrow murine derived dendritic cells of BALB/c and C57BL/6 mice, determining their antigen-presenting ability by expression of membrane markers (MHC-I and MHC-II), co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) and intracellular expression levels of IL-10 and IL-12 cytokines, studying their variations in the CD11c+ population, at day 6 and 9 of maturation and differentiation. We also analyzed whether stimulation with *A. simplex* larval antigens is enhanced by the co-administration of the TLR4 and TLR9 agonists (LPS *E. coli* 026B6 and CpG (ODN1826), respectively).

Subsequently, in addition to the markers indicated above, the effect of *A. simplex* larval products to CD₄ at day 6 of maturation, on intracellular expression of TNF- α , MyD88 and NF- κ B was also measured, to investigate the implication of this signaling pathway in the expression of cytokines by a TLR-dependent mechanism. Likewise, it was analyzed whether stimulation with *A. simplex* larval antigens is enhanced with co-administration of the TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9 agonists.

Then, it was determined the capacity of the DCs previously stimulated with *A. simplex* larval products to induce T_{reg}, from splenocytes extracted from mouse spleen. Specifically on the development of CD4 + lymphocytes CD25 + and CD8 + CD25 +, which express the Foxp3 transcription factor and produce IL-10.

Finally, the effect of *A. simplex* larval products on the lymphoproliferative capacity of naive splenocytes was studied. Again, it was tested whether stimulation with *A. simplex* larval antigens is enhanced with co-administration of the agonists of TLR4 and TLR9, LPS *E. coli* 026B6 and CpG (ODN1826), respectively.

As for the second part, carried out in humans, the relationship between the levels of anti-*A. simplex* antibodies in the serum of healthy individuals and the different subtypes of T and B cells was studied. In the case of septic patients, levels of anti-*A. simplex* antibodies in serum were related to the different LT α B and γ DB subpopulations and with the severity of the disease. The antibody isotypes studied were IgM, IgG, IgA, IgE e IgS (total immunoglobulines). The lymphocyte subpopulations determined were: CD3+, CD3+ CD4+, CD3+ CD8+, CD3+ CD56+, CD3+ α B, CD3+ CD4+ α B, CD3+ CD8+ α B, CD3+ CD56+ α B, CD3+ γ D, CD3+ CD8+ γ D, CD3+ CD56+ γ D, CD19+.

The main conclusions of this work were:

- Two types of responses were differentiated in the two mouse strains studied: the BALB/c strain was more susceptible, with an acute and inflammatory response, whereas the C57BL/6 mice developed a more discreet and resistant response. This demonstrates the coexistence of two opposing responses: Th1 versus Th2, generated by *A. simplex* larval antigens, and confirm that the host genetic basis plays a role in the development of a Th2 or T_{reg} response.

I. Summary

- *A. simplex* larval products significantly modified responses triggered by TLR agonists on DCs and were able to generate tolerogenic DCs that induce the expansion of functional T_{reg} *in vitro*. This suggests the existence of specific mechanisms, carried out by *A. simplex*, aimed at the modulation of the host immune system.
- The inversely proportional correlation observed between $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ NKT cells and specific anti-*A. simplex* antibodies, with the exception of IgG, points towards a possible role of NKT cells in the innate immunity to this parasite.
- Specific IgA antibodies are proposed as protectors against *A. simplex* infection and LT $\gamma\delta$ as compensating for the deficiency of this immunoglobulin isotype by the existence of an inverse correlation of both markers in healthy subjects. On the other hand, in septic patients, the decrease in levels of IgA anti-*A. simplex* was negatively associated with the severity of sepsis.
- Increased levels of IgG anti-*A. simplex* to greater severity of the sepsis, indicate that those patients previously immunized to *A. simplex*, could develop a more severe sepsis.

II. RESUMEN

RESUMEN

ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex*

La anisakidosis, causada por anisákidos (especialmente *Anisakis simplex*), es una parasitosis de distribución cosmopolita, con elevada prevalencia en países cuyos hábitos culinarios incluyen el consumo de pescado crudo o poco cocinado, como son Japón, España, países escandinavos, Perú o Chile. Hoy en día, supone una de las nematodosis más prevalentes en España, con una seroprevalencia variable entre las diferentes regiones españolas, con tasas que oscilan entre el 0,43% de Galicia y el 15,7% y 22,1% en regiones del centro y del sur, respectivamente. La parasitación por la larva L3 de anisákidos puede dar lugar a distintos cuadros clínicos, de carácter agudo o crónico, o por el contrario no dar sintomatología alguna. Estos cuadros están relacionados con la invasión de la larva L3 de la mucosa gastrointestinal mediante la rotura mecánica de los tejidos y la secreción de potentes enzimas proteolíticas capaces de degradar la matriz extracelular. Durante este proceso, las larvas de *A. simplex* despliegan mecanismos para modular la dicotomía de la respuesta inmune del hospedador en su propio beneficio, como es su acción anticoagulante o su capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos, entre otras.

Por otro lado, las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno profesionales con una capacidad extraordinaria para estimular linfocitos T vírgenes e iniciar las respuestas inmunológicas. Las CDs son también importantes en el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio. Esta capacidad para modular las respuestas de los linfocitos T es indudablemente importante para discriminar antígenos propios y no propios asociados a mucosas. Es por este motivo que las CDs son consideradas claves en la regulación de las respuestas inmunitarias, así como punto de unión entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Además, las CDs son muy abundantes en la mucosa intestinal (*lamina propria*), y teniendo en cuenta la localización de las larvas en la anisakidosis intestinal, resulta lógico pensar que los antígenos larvarios de *A. simplex* se depositan directamente sobre la *lamina propria*, siendo inmediatamente capturados por las CDs locales. Los antígenos serían posteriormente vehiculizados por las CDs a través de los conductos linfáticos para ser presentados a los linfocitos T por las CDs en los ganglios linfáticos locales. En función del grado de activación de las CDs, así como del tipo de citocinas secretadas, los linfocitos T vírgenes se diferenciarán en linfocitos Th1, Th2, Th17 o T reguladores (T_{reg}). Los T_{reg} son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa inhibiendo la activación del sistema inmunológico permitiendo el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia de lo propio.

El interés sobre los T_{reg} ha aumentado por las evidencias encontradas en modelos experimentales murinos que demuestran que el potencial inmunosupresor de estas células puede manipularse terapéuticamente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y facilitar la tolerancia frente a trasplantes, pudiendo también ser eliminadas específicamente para potenciar la inmunoterapia frente al cáncer. En

modelos murinos se ha comprobado que la presencia de T_{reg} CD4+CD25+ juega un papel importante en la mucosa mediante la supresión de respuestas inmunológicas frente a la flora intestinal, así como, frente a agentes patógenos.

Por otro lado, el estudio de los mecanismos por los cuales los parásitos manipulan la respuesta inmune a través de moléculas anti-inflamatorias es de interés no solo por la aplicación directa sobre el desarrollo de estrategias anti-helmínticas, sino también por el desarrollo de nuevos productos anti-inflamatorios para pacientes aquejados de enfermedades inflamatorias, autoinmunes o alérgicas. Se sospecha que la elevada prevalencia de atopia y enfermedades alérgicas y autoinmunes del mundo occidental está relacionada con los bajos niveles de infecciones helmínticas más que con diferencias genéticas. Por ejemplo, se han comprobado los efectos beneficiosos de *Trichuris suis* sobre la enfermedad inflamatoria intestinal o los efectos preventivos de *Schistosoma mansoni*, *Heligmosomoides polygirus* y *Trichinella spiralis* sobre la diabetes tipo 1.

Las células del sistema inmune reconocen patógenos mediante patrones especiales a través de receptores de la superficie celular. Estos receptores, denominados *Toll-like receptors* (TLRs), son los encargados de la señalización intracelular de las células inmunitarias, dando lugar a una activación del factor nuclear NF- κ B, responsable de movilizar efectos adyuvantes inmunológicos, principalmente mediados por citocinas proinflamatorias. Los diferentes patógenos, y por tanto también de los helmintos, pueden tener efectos directos sobre las respuestas inmunológicas innatas a través de estos receptores. Un ejemplo, son las moléculas glicosiladas, expresadas y secretadas por *S. mansoni*, que se unen a los receptores tipo C-selectinas y antagonizan una vía pro-inflamatoria mediada por TLR. Asimismo, se ha demostrado que la activación inmunológica crónica asociada con las infecciones intestinales helmínticas resultan en señales de transducción incorrectas y anergia, habiéndose incluso propuesto algunos factores de transcripción como señales terapéuticas. En las CDs tolerogénicas se ha descrito la sobre-expresión de algunos factores de transcripción, por lo que resulta interesante detectar los posibles cambios en la señalización asociados con respuestas tolerogénicas Th1 o Th2.

De este modo, el estudio de las sustancias inmunomoduladoras derivadas de parásitos pueden explicar por qué las infecciones activas por helmintos reducen la eficacia de las vacunas convencionales y promueven la susceptibilidad frente a infecciones por VIH, malaria o tuberculosis a través de la generación de T_{reg} que podrían ejercer su función local o sistémicamente. Además, el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los parásitos manipulan la respuesta inmunológica resulta de especial interés, no solo por su aplicación directa a la mejora de estrategias antihelmínticas, sino también para el desarrollo de nuevas terapias anti-inflamatorias.

El objetivo principal de este trabajo es investigar si los antígenos larvarios de *A. simplex* tienen propiedades inmunomoduladoras mediante la inducción de CDs tolerogénicas capaces de inducir la expansión de T_{reg}. En este sentido, los objetivos de esta Tesis Doctoral se pueden dividir en dos partes bien diferenciadas: estudios realizados *in vitro* en modelos murinos y, por otro lado, estudios realizados en humanos.

En los estudios realizados en modelos murinos, siempre para ambas cepas de ratón ensayadas, se estudiaron los efectos de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre la función y fenotipo de las CDs y los linfocitos T, a la hora de iniciar una respuesta tolerogénica.

Por su parte, en los estudios en humanos, si bien la hipótesis experimental se basó en que los productos larvarios de *A. simplex* podrían actuar como mediadores de inmunosupresión, en este caso se determinó su interacción directa con las CDs de la mucosa intestinal y su relación con la producción de señales tolerogénicas capaces de inducir cambios en las poblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ (LT $\alpha\beta$ y LT $\gamma\delta$). También se profundizó en el papel inmunosupresor de la sepsis, la cual se ha visto que puede aumentar la susceptibilidad del hospedador ante infecciones secundarias oportunistas o reactivando infecciones latentes. Por tanto, el potencial papel inmunosupresor de los antígenos larvarios de *A. simplex* podría suponer un descenso de las poblaciones de LT $\gamma\delta$ tras un contacto previo con el parásito. En conjunto, se determinaron los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en individuos sanos y pacientes sépticos y su relación con las distintas poblaciones de linfocitos T y B.

Por tanto, la primera parte de este trabajo se centra en el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre CDs de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6, determinándose su capacidad presentadora de antígeno por la expresión de marcadores de membrana (MHC-I y MHC-II), moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y los niveles de expresión intracelular de las citocinas IL-10 y IL-12, estudiando sus variaciones en la población CD11c+, a día 6 y 9 de maduración y diferenciación. Así mismo, se analizó si la estimulación con los antígenos larvarios de *A. simplex* se ve potenciada con la administración conjunta de los agonistas de TLR4 y TLR9, LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826), respectivamente.

Posteriormente, se estudió, a día 6 de maduración, el efecto de la adición de los productos larvarios de *A. simplex* a CDs midiéndose, además de los marcadores indicados anteriormente, la expresión intracelular de TNF- α , MyD88 y NF κ B, para investigar la implicación de esta vía de señalización en la expresión de citocinas mediante un mecanismo TLR-dependiente. De tal modo se comprobó si la estimulación con los antígenos larvarios de *A. simplex* se ve potenciada con la administración conjunta de los agonistas de TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9.

Una vez establecido todo lo anterior, se determinó la capacidad de las CDs previamente estimuladas con los productos larvarios de *A. simplex*, para inducir la generación de T_{reg}, a partir de esplenocitos extraídos de bazo de ratón, concretamente sobre el desarrollo de linfocitos CD4+CD25+ y CD8+CD25+, que expresan el factor de transcripción Foxp3 y producen IL-10.

Por último, se estudió el efecto de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la capacidad lifoproliferativa de esplenocitos vírgenes y, de nuevo, se comprobó si la estimulación con los antígenos larvarios de *A. simplex* se ve potenciada con la

administración conjunta de los agonistas de TLR4 y TLR9, LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826), respectivamente.

En cuanto a la segunda parte, llevada a cabo en humanos, se determinó la relación entre los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en el suero de individuos sanos y los diferentes subtipos de linfocitos T y B. En el caso de los pacientes sépticos, los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en suero se relacionaron con los diferentes subtipos de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y la severidad de la enfermedad. Los isotipos de anticuerpos analizados fueron IgM, IgG, IgA, IgE e IgS (inmunoglobulinas totales), y las siguientes poblaciones linfocitarias: CD3+, CD3+ CD4+, CD3+ CD8+, CD3+ CD56+, CD3+ $\alpha\beta$, CD3+ CD4+ $\alpha\beta$, CD3+ CD8+ $\alpha\beta$, CD3+ CD56+ $\alpha\beta$, CD3+ $\gamma\delta$, CD3+ CD8+ $\gamma\delta$, CD3+ CD56+ $\gamma\delta$, CD19+.

Las principales conclusiones de este trabajo fueron:

- Se diferenciaron dos tipos de respuestas en las dos cepas de ratón estudiadas: la cepa BALB/c resultó más susceptible, con una respuesta aguda e inflamatoria, mientras que los ratones C57BL/6 desarrollaron una respuesta más discreta y resistente. Esto demuestra la coexistencia de dos respuestas de carácter opuesto: Th1 *versus* Th2, generada por los antígenos larvarios de *A. simplex* y confirman que la base genética del hospedador es primordial en el desarrollo de una respuesta Th2 o T_{reg}.
- Los productos larvarios de *A. simplex* modificaron de forma significativa las respuestas desencadenadas por los agonistas de los TLR sobre las CDs y generaron CDs tolerogénicas que inducen la expansión de T_{reg} funcionales *in vitro*. Esto sugiere la existencia de mecanismos específicos por parte del parásito, encaminados a la modulación del sistema inmunitario del hospedador.
- La correlación inversamente proporcional observada entre las células NKT $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ y los anticuerpos específicos anti-*A. simplex*, con excepción de la IgG, orienta hacia un posible papel de las células NKT en la inmunidad innata frente a este parásito.
- Se proponen los anticuerpos IgA específicos como protectores frente a la infección por *A. simplex* y los LT $\gamma\delta$ como compensadores de la deficiencia de este isotipo de inmunoglobulina por la existencia de una correlación inversa de ambos marcadores en sujetos sanos. Por otro lado, en pacientes sépticos, el descenso de los niveles de IgA anti-*A. simplex* se asoció negativamente con la gravedad de la sepsis.
- El aumento de los niveles de IgG anti-*A. simplex* a mayor severidad del cuadro séptico, indican que aquellos pacientes previamente inmunizados a dicho parásito, podrían desarrollar un cuadro séptico más grave.

III. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La anisakidosis (infección por anisákidos, especialmente *Anisakis simplex*) es hoy en día una de las nematodosis (infecciones por nematodos parásitos) más prevalentes en España. Se trata de una enfermedad humana, aun cuando el ser humano no es el hospedador definitivo de este parásito, ya que lo son los mamíferos marinos, por lo que se definió como antropozoonosis por Sprent en 1969.

La anisakidosis presenta una distribución mundial, si bien la mayoría de los casos se registran anualmente en Japón, debido a sus hábitos culinarios. En España la prevalencia exacta es desconocida, aunque los últimos datos apuntan a que es una de las nematodosis más prevalentes en la actualidad.

En efecto, estudios previos han demostrado que la seroprevalencia es muy variable entre las diferentes regiones españolas, con tasas que oscilan entre el 0,43% de Galicia y el 15,7% en regiones del centro, así como 22,1% en regiones del sur (Valiñas *et al.*, 2001; Fernandez de Corres *et al.*, 2001; del Rey Moreno *et al.*, 2006). Por otra parte, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, en colaboración con el equipo del Dr. Ubeira de la Universidad de Santiago de Compostela, se halló en la Comunidad de Madrid una seroprevalencia de IgE específica anti-*A. simplex* del 12,4% (un 11,7% entre sujetos sanos y un 16% entre pacientes con patologías no digestivas ni alérgicas). Se ha observado, asimismo, que la positividad fue más prevalente entre los sujetos que habitualmente consumían pescado fresco o poco cocinado que entre los consumidores de pescado congelado, cocido o asado (Puentes *et al.*, 2008).

Esos resultados, junto con las elevadas tasas de consumo de pescado y la adquisición de nuevos hábitos alimentarios cada vez más populares (sushi, ceviche) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2012), apoyan el interés de llevar a cabo investigaciones en este campo de la parasitología en España.

Por otro lado, es amplia la literatura en la que los helmintos, y en concreto, los nematodos, se definen como expertos en la regulación del sistema inmune del hospedador al que parasitan a su favor (Maizels, 2016). Esta capacidad parece estar relacionada con infecciones crónicas y largas, que muchas veces son asintomáticas, como en el caso de la bilharziosis por *Schistosoma*. En el caso del *A. simplex*, la parasitación se caracteriza, sin embargo, por ser de corta duración e intermitente, aún cuando las consecuencias puedan prolongarse en el tiempo mucho después de la eliminación del parásito. Esto hace plantearse si este parásito, a pesar de que no ocasione parasitaciones crónicas, presenta mecanismos para inmunomodular el sistema inmunitario de su hospedador.

Estudios previos han demostrado que los productos larvarios de *A. simplex* han desarrollado mecanismos para modular en su propio beneficio la dicotomía de la respuesta inmune del hospedador, como es la supresión de la respuesta Th1 por su capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos (Cuéllar *et al.*, 1998) o la producción de un homólogo del factor inhibidor de la

migración de macrófagos capaz de suprimir la respuesta Th2 en un modelo de asma alérgica mediante el reclutamiento de linfocitos T CD4+CD25+Foxp3+ (Park *et al.*, 2009).

A diferencia de lo que ocurre con la enfermedad parasitaria, la modulación de la respuesta inmune inflamatoria por helmintos, y concretamente *A. simplex*, no tiene necesariamente que requerir la infección con el parásito vivo, sino que se podría lograr mediante el uso de productos solubles derivados de las larvas. Además, el uso terapéutico de los helmintos vivos entraña riesgos dignos de ser tenidos en cuenta y que se evitarían mediante este abordaje terapéutico.

La investigación de los efectos de las moléculas derivadas del parásito *A. simplex* sobre el sistema inmunitario puede proporcionar estrategias de tratamiento prometedoras para curar enfermedades autoinmunes de una forma segura y controlable. Asimismo, la demostración del potencial inmunosupresor de los productos larvarios de *A. simplex* abriría una nueva perspectiva para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, así como de los trastornos alérgicos, generando más líneas de investigación.

1. Características de *Anisakis* spp.

1.1. Taxonomía

Los anisákidos son nematodos incluidos en la Clase Chromadorea, Orden Rhabditida, Suborden Rhabditina, Infraorden Ascaridomorpha, Superfamilia Ascaridoidea, Familia Anisakidae (De Ley, 2006; Blaxter, 2009). La familia Anisakidae comprende al menos 24 géneros, siendo los más conocidos *Phocascaris*, *Phocanamea*, *Contracaecum* y *Anisakis*. Dentro del género *Anisakis* se admiten al menos nueve especies, siendo las más estudiadas las incluidas dentro del complejo *Anisakis simplex* (Tabla 1) (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009).

De todas las especies incluidas en el género *Anisakis*, *A. simplex* es el principal responsable de los episodios de parasitosis y alergia. Por este motivo, en la actualidad es considerado un problema emergente (Audicana *et al.*, 2002; Audicana y Kennedy, 2008). El resto de especies pertenecientes al género *Anisakis* también se han visto como agentes causales de la anisakidosis humana.

Así mismo, los últimos estudios genéticos realizados han permitido obtener una clasificación más exacta del complejo de *A. simplex*, denominado *sensu lato* (Björkstén *et al.*, 2008). De este modo, quedan definidas tres especies gemelas: *A. pegreffii*, *A. simplex sensu stricto* (s.s.) y *A. simplex C*, que difieren en su estructura genética, preferencias ecológicas, hospedadores y distribución geográfica (Mattiucci *et al.*, 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008), así como en su patogenia (Kirstein *et al.*, 2007). En cambio, morfológicamente son exactamente iguales y, por tanto, sería imposible diferenciarlos a simple vista.

Tabla 1. Subfamilia Anisakinae (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009)

| Género <i>Anisakis</i> | Complejo <i>Anisakis simplex</i> | <i>A. simplex sensu stricto</i> <i>A. simplex C</i> <i>A. pegreffii</i> |
|--------------------------------|--|---|
| | Complejo <i>Anisakis physeteris</i> | <i>A. physeteris</i> <i>A. paggiae</i> <i>A. brevispiculata</i> |
| | <i>Anisakis typica</i> <i>Anisakis ziphidarum</i> <i>Anisakis schupakovi</i> <i>Anisakis nascetti</i> | |
| Género <i>Pseudoterranova</i> | | |
| Género <i>Contracaecum</i> | | |
| Género <i>Hysterothylacium</i> | | |

1.2. Características morfológicas

La especie *A. simplex*, principal implicada en los procesos patológicos humanos, presenta un cuerpo vermiforme y sin segmentación. En su forma encapsulada en el músculo del pescado son de color pardo-anaranjado, mientras que en su forma libre adquieren un color blanquecino. Su longitud oscila entre 1 y 3 cm, y su anchura entre 0,1 y 0,6 mm (Smith, 1983). Su epidermis genera una cutícula de 1,5 µm de grosor (Fredericksen y Specian, 1981) y bajo la lupa se pueden apreciar estriaciones finas y transversales, más profundas a medida que nos acercamos a los extremos del nematodo (Fukuda *et al.*, 1988) (Figura 1).



Figura 1. Larvas de *Anisakis simplex*.

El sistema digestivo es completo: consta de boca, esófago, intestino y ano. La cavidad bucal es la característica de un ascárido: triangular y con un diente asimétrico en el extremo anterior (diente perforador), que el parásito emplea para la fijación o bien la penetración en el hospedador (Möller y Anders, 1986) (Figura 2). El esófago carece de apéndices ventriculares y el intestino de ciegos. El extremo posterior del nematodo es

redondeado y la cola termina en un mucro (Möller y Anders, 1986; Pereira-Bueno, 1992).

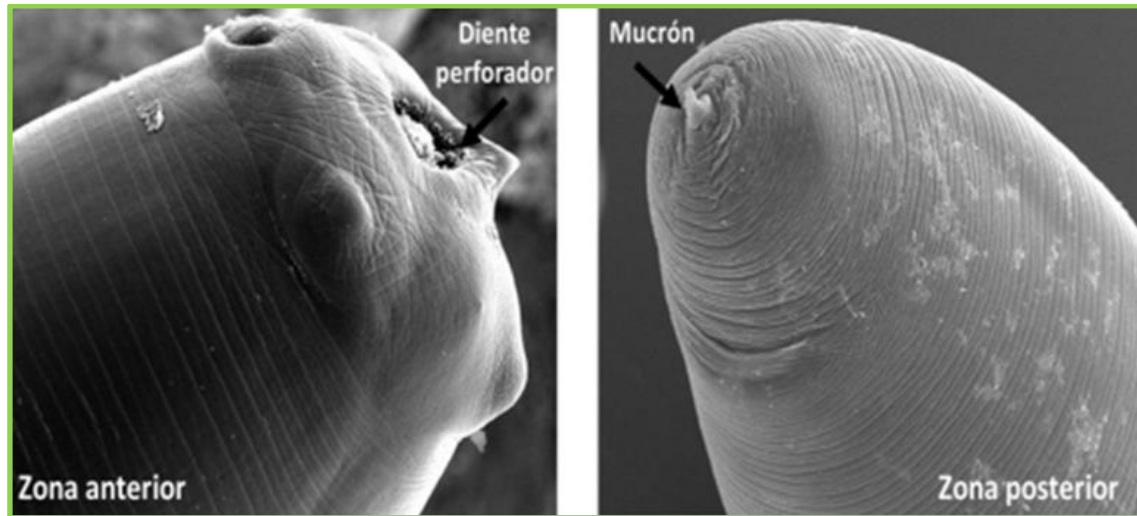


Figura 2. Morfología de *Anisakis simplex* detallada. Extremos anterior y posterior (Olivares, 2013).

Además, presenta un sistema nervioso rudimentario, en el que destaca un anillo nervioso presente en el tercio anterior del parásito. Este anillo es visible a simple vista y característico de *A. simplex*, por lo que facilita su identificación manual.

Por último, el sistema excretor lo forman una glándula y un conducto que finaliza en la apertura de la cavidad bucal (Cheng, 1982).

1.3. Ciclo biológico de *Anisakis* spp.

El ciclo biológico del género *Anisakis* consta de un estadio huevo, cuatro estadios larvarios y un estadio adulto (Mattiucci y Nascetti, 2008). Además de sus hospedadores definitivos e intermediarios, pueden participar también hospedadores paraténicos u hospedadores accidentales. Es, por tanto, un ciclo relativamente complejo, en el que todos sus participantes, ya sean vertebrados o invertebrados, pertenecen al ecosistema marino o bien están muy ligados a él, como el ser humano (Figura 3).

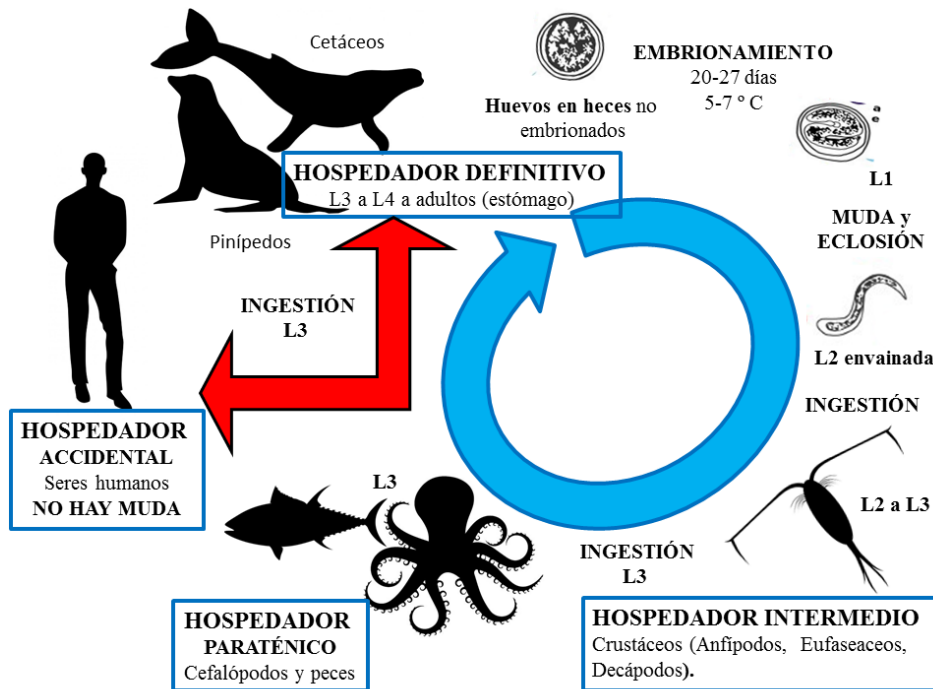


Figura 3. Esquema del ciclo biológico de los anisákidos.

Los hospedadores definitivos del género *Anisakis* son mamíferos marinos como ballenas, delfines, focas o leones marinos (cetáceos y pinnípedos) (Mattiucci y Nascetti., 2006). Es en el sistema digestivo de estos hospedadores definitivos donde se encuentran los adultos del género *Anisakis*. Tras la copulación, las hembras depositan los huevos que serán expulsados al exterior a través de las heces.

Después, los huevos entran en una fase de embrionamiento dentro del medio acuático (Smith, 1983), y en función de la temperatura del agua, que determinará su viabilidad (Højgaard, 1998), las larvas de estadio 1 (L1) salen del huevo y se transforman en larvas de segundo estadio (L2). Las L2 mantienen la cutícula de la muda anterior a modo de vaina, pues esta les proporciona resistencia para sobrevivir libres en el medio marino durante unas cuatro semanas.

Posteriormente, las L2 pueden ser ingeridas por crustáceos pequeños (plancton), los cuales constituyen sus hospedadores intermediarios. En ellos, las L2 pierden la vaina y se transforman en larvas de tercer estadio (L3), que presentan capacidad infectiva.

A su vez, los crustáceos portadores de L3 son ingeridos por peces o cefalópodos. Estos animales actúan como hospedadores paraténicos, es decir, en ellos no tiene lugar cambio de estadio alguno de las L3, aunque sí podrán aumentar de tamaño y se depositarán en las vísceras y en la carne de los mismos.

Finalmente, los hospedadores definitivos adquieren larvas L3 por ingestión de los peces, del zooplankton o de los cefalópodos infectados. En el estómago de estos mamíferos marinos tiene lugar la tercera muda con paso a larva de cuarto estadio (L4)

que, posteriormente, da lugar a los adultos. El ciclo se cierra con la expulsión de los huevos del parásito con las heces del hospedador definitivo.

El ser humano podrá actuar como hospedador accidental al consumir pescado o cefalópodos, crudos o poco cocinados, que estén infectados por larvas L3. Aunque en el ser humano las larvas no serán capaces de alcanzar el estadio adulto y, por tanto, no se completará su ciclo biológico, podrá desarrollar anisakidosis.

Por tanto, la anisakiosis es una antropozoonosis en respuesta a la presencia de las larvas L3 en el sistema digestivo del hospedador, que tendrá como principal objetivo la expulsión y eliminación del nematodo del organismo.

1.4. Distribución geográfica

Los anisákidos presentan una distribución cosmopolita, derivada del hábitat de sus hospedadores. Se trata de especies ecológicamente distintas y de diferente distribución geográfica, y, por tanto, con diferentes hospedadores definitivos y diferentes ciclos de vida.

En el caso concreto de las especies del complejo *A. simplex* (*A. pegreffii*, *A. simplex* s.s. y *A. simplex* C), los hospedadores definitivos son cetáceos tales como rorcuales, orcas, delfines, belugas o marsopas, mientras que peces y cefalópodos actúan como hospedadores paraténicos (Mattiucci y Nascetti, 2008).

Las principales especies que componen el género *Anisakis* se distribuyen de la siguiente manera: *A. pegreffii* se encuentra principalmente en el mar Mediterráneo y en el hemisferio sur; *A. simplex* s.s. en el Atlántico norte y en el océano Pacífico, y *A. simplex* C se encuentra en las costas del Pacífico y en el hemisferio sur (Mattiucci *et al.*, 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008) (Figura 4).

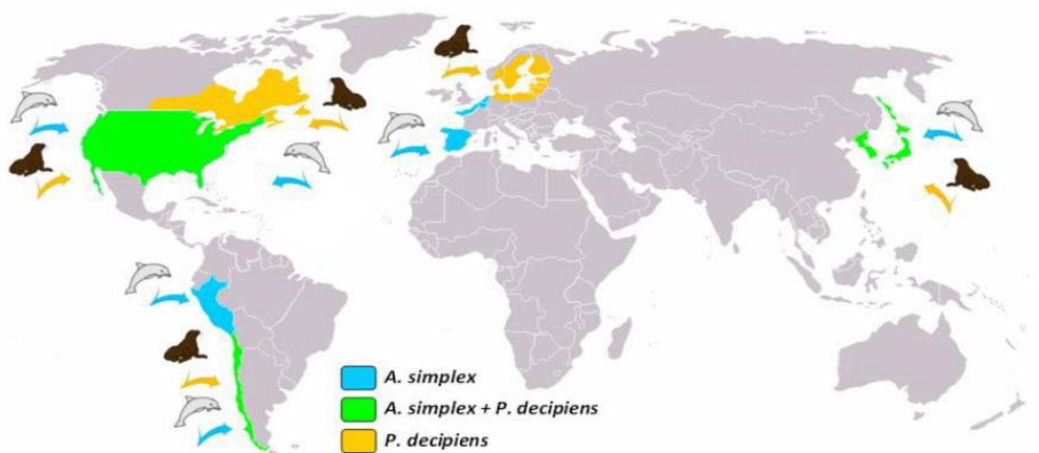


Figura 4. Distribución mundial de *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens* (Hochberg y Hamer, 2010).

1.5. Hospedadores

1.5.1. Principales especies infectadas

Según el informe elaborado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), todos los pescados destinados al consumo humano están potencialmente parasitados, alcanzando, en muchos casos, tasas de hasta el 100 % (Tabla 2).

La prevalencia y tasa de infectación de *A. simplex* depende de varios factores: hospedador definitivo, zona geográfica, época del año y las características propias de cada especie de anisákido (Petrie *et al.*, 2007). Así, como queda reflejado en la Tabla 2, una misma especie de pescado presentará distinta tasa de parasitación en función de la zona geográfica en la que habite.

La especie que presenta la mayor frecuencia de parasitación es la merluza (*Merluccius* sp.) cuya prevalencia varía entre el 12% y el 100%, seguida de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) con un 94%, mientras que en el jurel (*Trachurus trachurus*) oscila entre el 0% y el 76% (Osanz Mur, 2001; Cuéllar *et al.*, 1991; Silva y Eiras, 2003).

Tabla 2. Prevalencia de larvas de *Anisakis simplex* en pescados de diferentes áreas (EFSA, 2010).

| Área | Especie | Número de muestras | Prevalencia / intensidad (media±SD, rango) |
|-----------------------------|--|-----------------------------|---|
| Mar de Barents | Bacalao | 212 (océano) 207 (costa) | 96% / 4,3 y 6,1 (océano y costa, respectivamente) |
| Norte de Noruega | Abadejo | - | 100% / 2,6 |
| Costa portuguesa | Jurel | 58 | 76% / 6,2±10,2 (1-46) |
| | Caballa | 45 | 96% / 12,7±14,8 (1-80) |
| | Merluza | 3 | 100% / 51,3±5,7 (45-59) |
| | Bacaladilla | 65 | 94% / 14,3±18,9 (1-89) |
| Madeira | Tonino | 154 | 70% / 2,2±0,12 (1-6) |
| Costa mediterránea (España) | Bacaladilla (17-24 cm) | 224 | 12% / 1,19 |
| | Bacaladilla (>25 cm) | 77 | 17% / 1,5 |
| | Merluza | - | 41% / 1,7 |
| Costa mediterránea (Italia) | Chicharro | 822 | 80-100% / 19,3-36,8 |
| Galicia | Merluza, bacaladilla, maruca, rape, caballa, sargo y caballa | - | >70% / >14 |
| Francia | Bacalao | 304 | 1,97% / 1,5±0,8 (1-3) |
| | Merlán | 169 | 3,55% / 1,14±0,5 (1-2) |

Además, en dicho informe se indican los efectos que producen diferentes tratamientos, incluidos los culinarios, sobre la viabilidad de las larvas, comprobándose que solo la congelación y el cocinado durante un mínimo de tiempo son eficaces para conseguir su eliminación (EFSA, 2010). En la Tabla 3 se muestran los tiempos necesarios para eliminar las larvas de *Anisakis*, dependiendo del tratamiento empleado.

Tabla 3. Diferentes tratamientos sobre las larvas de *Anisakis* en los pescados (EFSA, 2010).

| Pescado | Tratamiento | Parámetros de tratamiento / Tiempo de eliminación |
|------------------------------|----------------------|--|
| Arenque | Salado | 5% NaCl / >17 semanas |
| | | 6-7% NaCl / 10-12 semanas |
| | | 8-9% NaCl / 6 semanas |
| | Salado en seco | 20 días |
| Anchoa | Marinado | 10% ácido acético + 12% sal / mínimo 5 días |
| | | 2,4% ácido acético + 6% NaCl / 35 días |
| | | 10% ácido acético + 12% NaCl / 5 días |
| Sardina | Marinado | 6% ácido acético + 10% NaCl 24h + 4°C / 13 días |
| Arenque | Marinado | 28 días en escabeche (6,3% NaCl+ 3,7% ácido acético) |
| Salmón rojo y rocote canario | Congelación | -35°C / 15h + -18°C / 24h |
| Fletán | Congelación | -15°C / 96h; -20°C / 60h; -30°C / 20h; -40°C / 9h |
| Larvas <i>in vitro</i> | Congelación | -15°C / pocos minutos |
| | Calentamiento | 60°C / >15 min |
| | Calentamiento | >60° (temperatura interior) / 1 min |
| | Calentamiento | 74°C / 15 s |
| | Calentamiento | 60°C / 10 min (filetes 3 cm) |
| | Extractos de plantas | [6]-shogaol 62,4 µg/ml; [6]-gingerol 250 µg/ml |
| Salmón real y fletán | Altas presiones | 414 MPa / 30-60 s |
| | | 276 Mpa / 90-180 s |
| | | 207 Mpa / 180 s |
| Arenque | Irradiación | 6-10 kGy |
| Congrio | Irradiación | >1 kGy |

Todas estas medidas se han venido considerando seguras para la destrucción de la larva viva, que hasta el momento, es la considerada como única responsable de los síntomas en individuos alérgicos a *Anisakis*. Sin embargo desde la implantación de estas medidas se han producido tanto notificaciones de reacciones alérgicas como nuevos avances en el reconocimiento inmunológico de antígenos de *Anisakis*, incluso muerto, por lo que cabe preguntarse si estas recomendaciones son suficientes para garantizar la seguridad del consumidor (AECOSAN, 2016).

En cuanto a si existe o no riesgo de que los pescados de acuicultura sean parasitados por las larvas de *Anisakis*, no existen en la actualidad datos concluyentes. El informe de la EFSA (2010) solo recoge datos relativos al salmón, si bien alerta del riesgo cuando los ejemplares son alimentados con comida fresca, no procesada, o cuando se capturan larvas o ejemplares jóvenes para engordarlos posteriormente en cautividad.

En el caso concreto de España, en 2012 la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, evaluó la presencia de L3 de *Anisakis* spp. en 1000 ejemplares de dorada, lubina, rodaballo y corvina procedentes de 45 granjas y no se observó parasitación alguna. Por tanto, parece que, en lo que se refiere a este país, no existe por

el momento riesgo de que los pescados de acuicultura sean parasitados por las larvas de *Anisakis* (APROMAR, 2012).

1.5.2. Localización en peces y cefalópodos

De forma general, una vez que los peces ingieren las L3 al alimentarse de sus hospedadores intermediarios, las larvas migran desde el sistema digestivo a la cavidad abdominal, donde se enrollan en forma de espiral bajo el tejido conectivo y se encapsulan. Primordialmente, se localizarán en la submucosa del tubo digestivo, cavidad abdominal, superficie hepática, gónadas y mesenterio (Smith y Wootten, 1978).

Además, las L3 pueden localizarse en la musculatura de los pescados (Ruíz-Valero *et al.*, 1992; Abollo *et al.*, 2001; Tejada, 2009). Hay estudios que afirman que entre el 86% y 98% de las larvas se localizaban en la cavidad abdominal o vísceras y el resto en musculatura, en especial en la musculatura ventral (Karl, 2008). No obstante, no existe un acuerdo claro sobre si esta localización solo tiene lugar tras la muerte del hospedador, o puede darse antes.

Al respecto, Van Thiel (1960), y Smith y Wootten (1975) sugieren que la migración ocurre cuando el pescado capturado es mantenido en hielo durante más de 48 horas. Por el contrario, Roepstorff *et al.* (1993) no encontraron evidencias de que tal migración esté relacionada con las condiciones de almacenamiento *post-mortem*. Otros estudios indican que dicha migración varía en función de la especie de anisákido, así como del tiempo que transcurre desde la infección del pez (Quiazon *et al.*, 2011). Así, la distribución de las larvas en el músculo y las vísceras podría depender de la especie de pescado, como es el caso del salmón del Pacífico, en el que el 87 % de las L3 de *A. simplex* se localizan en la musculatura abdominal (Deadorff y Kent, 1989; Karl *et al.*, 2011) (Figura 5).



Figura 5. Larvas de *Anisakis simplex* en Merluza (*Merluccius merluccius*) y en manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Olivares, 2013).

En el caso de los calamares, las larvas se ubican en la pared externa del estómago y en la musculatura del manto (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2009). En especies de calamar

gigante capturados en las costas del Pacífico sur, se han detectado en un 57% de los ejemplares la presencia de larvas de *Anisakis* sp., todas ellas localizadas en la musculatura del manto (Céspedes *et al.*, 2011).

1.5.3. Co-evolución parásito-hospedador

La filogenia de los parásitos está estrechamente ligada a la de sus hospedadores definitivos. Así, la especiación del género *Anisakis* se habría desarrollado de forma paralela al aislamiento geográfico de sus hospedadores.

Las condiciones necesarias para propiciar el proceso se dieron, probablemente, durante el Mioceno, Plioceno y Pleistoceno, cuando variaciones climáticas extremas favorecieron procesos de co-adaptación. Después, en los periodos interglaciares, se habrían ido expandiendo a medida que lo hicieron sus hospedadores (Mattiucci y Nascetti, 2008).

Ahora bien, para comprender todo este proceso es necesario determinar tanto el origen evolutivo de los hospedadores como el del propio parásito. En este caso concreto, los hospedadores definitivos, en su mayoría cetáceos, evolucionaron a partir de un grupo de ungulados emparentados directamente con los hipopótamos. Surgieron a partir de un cetáceo anfibio extinto hace unos 45 millones de años llamado *Pakicetus*. Esto quiere decir que fueron de la tierra al mar, llevándose los precursores de los anisákidos adquiridos previamente en las etapas terrestres (Thewissen *et al.*, 2009).

Por otro lado, las especies del género *Anisakis* son nematodos. Los nematodos están incluidos en el Filo de invertebrados *Ecdysozoa*, junto a los artrópodos. Así, mediante el estudio filogenético del ARNr 18S, se agrupa a los nematodos en un taxón hermano a los artrópodos que presenta gran similitud a nivel del género *Trichinella* (Aguinaldo *et al.*, 1997).

Por su parte, como nematodos, las especies del género *Anisakis* presentan su origen en los ascáridos. De hecho, *Ascaris lumbricoides* es el único ascárido que completa el ciclo biológico en el hombre y, por tanto, el mejor adaptado a nuestra especie y el que ha convivido más tiempo con ella (Blaxter *et al.*, 1998).

La cuestión es, cómo llegó *A. lumbricoides* a adaptarse al *Homo sapiens*. Loreille y Bouchet (2003) analizaron la evolución de la ascariosis en hombres y cerdos y concluyeron que los homínidos fueron los hospedadores ancestrales y a partir de ellos se infectaron los cerdos (*Ascaris suum*). Esta conclusión se basó en las siguientes premisas:

- Los ancestros de los cerdos domésticos datan del Mioceno. En cuevas y rocas del Oeste de Europa hay pinturas de escenas de caza de jabalí de hace 25.000 años.
- Los cerdos domésticos descienden todos de una única especie de jabalí euroasiático (*Sus scrofa*). Su domesticación probablemente ocurrió hace 9.000 años en

Oriente Medio y en el este del Mediterráneo, así como en el sudeste Asiático. Los cerdos domesticados se expandieron a través de Asia, Europa y África.

- Los huevos de *Ascaris* más antiguos encontrados tienen unos 30.000 años (Paleolítico Superior, Arcy-sur-Cure, Yonne, Francia) y no se encontraron restos de cerdos en el yacimiento.
- Los cerdos comen heces humanas y los humanos no comen heces porcinas.

En cuanto a cuándo comenzó la parasitación de los seres humanos por consumo de pescado, hay pocas fuentes documentales, pero sin duda ha de ir asociada al inicio de ese consumo. A este respecto, según Zugarramurdi *et al.* (1998), el primer registro del pescado como alimento de la especie *H. sapiens* tiene 380.000 años. Por su parte, Zohar y Briton (2011) encontraron dientes de un ciprínido en un yacimiento de *Homo Erectus* datado en 780.000 años (Gesher Benot Ya'aqov, Israel). Este hallazgo, por el momento, está considerado como la evidencia más antigua del consumo de pescado en la prehistoria.

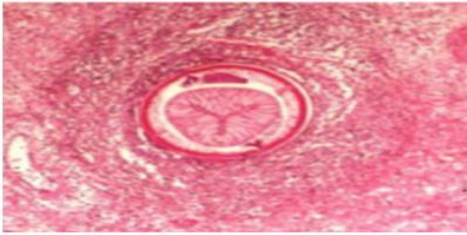
En conclusión, a lo largo de la evolución la coexistencia de los helmintos parásitos con el ser humano ha sido estrecha y viene de muy lejos, lo que ha dado lugar a la "Hipótesis de los Helmintos", que será desarrollada en apartados posteriores. Asimismo, la evolución de los parásitos y sus hospedadores demuestra que los ascáridos terrestres siguieron a sus hospedadores cuando estos accedieron al medio marino y allí cada uno originó nuevas especies como resultado de su adaptación al nuevo hábitat.

2. Anisakidosis

En primer lugar, conviene diferenciar entre los términos *anisakiosis* y *anisakidosis*. En sentido estricto, el término *anisakiosis* se refiere a la patología producida por *Anisakis* spp. mientras que el término *anisakidosis* se refiere a las enfermedades producidas por diferentes especies pertenecientes a los géneros incluidos en la familia *Anisakidae* (*Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*), si bien ambos términos conviven indistintamente en la literatura.

Así, la *anisakidosis* es una enfermedad humana, causada por la ingestión de pescado crudo o poco cocinado, infectado por larvas vivas de anisákidos, principalmente de *A. simplex*. La *anisakiosis* se produce tras la ingestión de las L3 vivas de *A. simplex*, y según la localización de las lesiones, se puede considerar gástrica, intestinal o ectópica. Cuando se manifiestan síntomas alérgicos acompañando a las manifestaciones digestivas se considera *anisakidosis* gastroalérgica (AGA) (Sakanari, 1990; Daschner *et al.*, 2000) (Figura 6).

- **Gástrica:** Aguda (4-6 horas tras la ingestión). Dolor, náuseas, urticaria.
- **Intestinal:** tras 5-7 días desde la ingestión. Dolor fuerte, que se confunde con apendicitis.



- **Ectópica (extragastrointestinal):** larva en mesenterio, nódulos linfáticos, hígado, páncreas.
- **Gastroalérgica:** fiebre, angioedema, urticaria, asma, anafilaxia, poliartritis.



La penetración por la larva L3 de la mucosa digestiva origina dolor, lesiones traumáticas, hemorragia e inflamación.

Figura 6. Anisakidosis humana (Sakanari, 1990; Daschner *et al.*, 2000).

2.1. Tipos de anisakidosis

2.1.1. Anisakidosis gástrica

El estómago y el intestino son las localizaciones más habituales de la anisakidosis. La frecuencia de afectación gástrica o intestinal varía de unas regiones a otras. Así, la anisakidosis gástrica se ha descrito más habitualmente en Japón, con un 93% de afectación en estómago, frente a un 4,4% de afectación en intestino. Por el contrario, la afectación intestinal se ha descrito sobre todo en Holanda, con un 75,3% de casos frente a un 10,6% de anisakidosis gástrica (Smith *et al.*, 1978).

La causa de estas diferencias en la localización de la enfermedad según las regiones ha sido motivo de controversia. Se cree que puede depender de múltiples factores, como son los hábitos dietéticos, el tiempo de llenado del estómago, el sexo o incluso las técnicas diagnósticas empleadas para el estudio de la enfermedad (Ishikura *et al.*, 1993).

Respecto a su establecimiento y diagnóstico, la anisakidosis gástrica puede tener un desarrollo agudo o crónico y se describen a continuación.

Anisakidosis gástrica aguda

Habitualmente se desarrolla entre una y ocho horas tras la ingesta del pescado crudo, aunque en ocasiones puede iniciarse tras doce horas de la ingestión. Sus manifestaciones clínicas incluyen dolor epigástrico agudo, náuseas, vómitos, diarrea y prurito (Park *et al.*, 2008). La analítica puede caracterizarse por eosinofilia, frecuentemente acompañada de poca o nula leucocitosis (4-40%). Además, en un 70% de los casos se observa sangre en el jugo gástrico o en las heces (Yokogawa *et al.*, 1967). Pueden darse otros síntomas, pero suelen ser muy inespecíficos.

De este modo, la anisakidosis gástrica aguda es la manifestación clínica de la fase de penetración de la larva en la mucosa gástrica. Las larvas pueden penetrar total o parcialmente la mucosa, la submucosa e incluso la capa muscular del estómago.

En la mayoría de los casos, el diagnóstico indicado será la endoscopia digestiva alta, pues no solo permite observar las larvas y las lesiones asociadas a su penetración, si no también extraerlas. La localización más habitual es en la mucosa o submucosa del cuerpo gástrico, a lo largo de la curvatura mayor del estómago (Shibata *et al.*, 1989).

La penetración de la larva origina una serie de lesiones en la mucosa gástrica que pueden ir acompañadas de hemorragias puntuales o erosión y edema en el punto de penetración. Sin embargo, un gran porcentaje de pacientes quedan sin diagnosticar por presentar síntomas vagos o inespecíficos, similares a los presentados en otras patologías.

Anisakidosis gástrica crónica

La anisakidosis gástrica crónica aparece si la enfermedad cronifica. Tras la muerte de la larva de *Anisakis*, sus productos de degradación son reabsorbidos llevando a la formación de una lesión granulomatosa. Los síntomas pueden incluir dolor sordo a nivel de epigastrio, dispepsias, náuseas y vómitos, que duran desde algunos meses hasta varios años.

Las imágenes vistas mediante endoscopia varían de unos pacientes a otros, con lesiones tipo absceso y/o lesiones tipo granuloma. En este caso los restos larvarios son prácticamente inapreciables y se hallan en el centro de un tejido granulomatoso con colagenización e infiltración por células gigantes de cuerpo extraño, linfocitos y en menor medida eosinófilos.

En la anisakidosis gástrica crónica es importante el diagnóstico diferencial respecto a tumores submucosos o cáncer gástrico, ya que los hallazgos radiográficos y endoscópicos pueden ser similares a los observados en esas patologías (Ishikura *et al.*, 1993).

2.1.2. Anisakidosis intestinal

La anisakidosis intestinal aparece entre cinco a siete días tras la ingestión del pescado crudo. Clínicamente se asocia con dolor y distensión abdominal intensos, pudiendo aparecer una masa inflamatoria palpable que cause obstrucción intestinal (Park *et al.*, 2008; Nawa *et al.*, 2005). También se puede acompañar de diarrea con sangre o moco.

La localización más habitual de la anisakidosis intestinal es en el íleon. Por este motivo, puede llegar a confundirse con una apendicitis aguda, con ileitis, con la enfermedad de Crohn (EC) o con otras infecciones parasitarias (*Strongyloides*, *Ascaris*, *Ancylostoma*) o bacterianas (*Yersinia*, *Micobacterium*), así como con isquemia intestinal. De ahí que sea esencial realizar un diagnóstico diferencial con estas patologías (López-Serrano *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 1998; De Nicola *et al.*, 2005; Gutiérrez Ramos *et al.*, 2005).

Aunque se da con menor frecuencia, no conviene descartar otras posibles localizaciones del intestino delgado o el colon (Repiso Ortega *et al.*, 2003). Ocasionalmente, las larvas de los anisákidos pueden penetrar hasta la cavidad peritoneal u otras vísceras (anisakidosis extraintestinal) y causar un granuloma eosinofílico.

Para realizar el diagnóstico de anisakidosis intestinal la endoscopia no es útil, ya que las lesiones no son accesibles a la misma. El diagnóstico de elección será la cirugía, que permitirá la identificación directa de la larva o sus restos en la pieza quirúrgica o el examen histológico de la misma. En el líquido ascítico se pueden encontrar larvas libres que han migrado a través de la pared intestinal.

Anisakidosis intestinal crónica

En ocasiones, la infección primaria puede pasar desapercibida y la afectación intestinal se vuelve crónica. Las larvas migran a través de la pared intestinal y dan lugar a granulomas. Dichos granulomas pueden originar una estenosis del lumen intestinal e inducir a un diagnóstico erróneo, como un tumor benigno o, incluso, un tumor maligno. Así, existen varios casos descritos en la literatura de anisakidosis intestinal crónica en los que se ha realizado un diagnóstico erróneo de tumor duodenal obstructivo (Eskesen *et al.*, 2001) o carcinoma de colon (Shirahama *et al.*, 1990).

Además, se han descrito casos en los que se ha confundido la infección intestinal por *Anisakis* con enfermedad de Crohn (Baron *et al.*, 2014; Montalto *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 1983). Esto se debe a que ambas patologías son similares en algunos aspectos, como su carácter de inflamación granulomatosa y su preferente localización ileal. Son numerosos los casos que describen infecciones por *A. simplex* con lesiones similares a las producidas en la EC, he aquí algunos ejemplos:

- Viciano *et al.* (2001) publicaron en España un caso de ileítis eosinofílica segmentaria secundaria a *Anisakis*, considerando a las larvas de *A. simplex* en la etiología de la EC.

- Montalto *et al.* (2005) describen el caso de un hombre, consumidor habitual de pescado crudo, que fue intervenido a causa de un abdomen agudo inicialmente atribuido a EC y en el que, tras el examen histológico, encontraron una larva rodeada de un infiltrado eosinofílico.
- Baron *et al.* (2014) describen otro caso de una resección de íleon en un paciente con obstrucción intestinal inicialmente diagnosticado de EC. No encontraron parásitos en los cortes histológicos, pero sí un elevado porcentaje de eosinófilos, lo que sugería una infección parasitaria. El paciente había consumido anchoas crudas una semana antes del comienzo de los síntomas y presentaba una elevada tasa de anticuerpos IgE anti-*Anisakis*.
- Bavastrelli *et al.* (2001), tras describir un caso de ileítis donde un examen histológico mostró un granuloma eosinofílico rodeando una sección de larva de *A. simplex*, sugieren incluir la anisakidosis en el contexto de diagnóstico diferencial de los síndromes abdominales.

Por otra parte, también se han descrito casos de otros helmintos capaces de ocasionar lesiones similares a EC como es el caso de la enterocolitis causada por *Angiostrongylus costaricensis* (Liacouras *et al.*, 1993), o la bilharziosis por *S. mansoni* que puede presentar pólipos en la unión recto-sigmoidea con cambios inflamatorios granulomatosos (Waye y Hunt, 1982; Meybehm *et al.*, 1989).

La mayoría de casos de anisakidosis intestinal se diagnostican accidentalmente al tratar quirúrgicamente otras molestias, debido a que su estado crónico cursa con síntomas leves e incluso de forma asintomática (Ishikura *et al.*, 1969). Por tanto, el diagnóstico se realiza a través de la extracción quirúrgica de la lesión y su estudio histopatológico. Se busca la existencia de granulomas eosinofílicos y/o la presencia de las larvas de *Anisakis* (Dooley *et al.*, 1976).

2.1.3. Anisakidosis extraintestinal

Se denomina anisakidosis extraintestinal, ectópica o heteróloga a aquellas infecciones en las que las larvas de anisákidos han migrado a otros órganos extraintestinales. No son habituales, pero se han descrito múltiples localizaciones extraintestinales con afectación de la cavidad peritoneal (Nawa *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 1979; Rushovich *et al.*, 1983), boca, faringe o laringe por migración a través de reflujo gastroesofágico (Eguia *et al.*, 2003), así como de vísceras sólidas, pulmón (Kobayashi *et al.*, 1985), hígado o páncreas (Daschner *et al.*, 1998).

2.1.4. Anisakidosis alérgica

La anisakidosis es una infección parasitaria causada por nematodos que puede causar diversos tipos de reacciones alérgicas:

- **Agudas.** Desde una urticaria leve hasta broncoconstricción, angioedema e incluso shock anafiláctico (Daschner *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 1999).
- **Crónicas.** Cuadros alérgicos recurrentes con síntomas que abarcan principalmente el sistema digestivo y la piel.

De forma general, es común la aparición de eosinofilia y, con menos frecuencia, fiebre. Sin embargo, dado que los síntomas se manifiestan de forma aguda tras la ingesta de pescado crudo o poco cocinado, es fácil confundirla con alergia a estos alimentos.

Los dos cuadros principales se describen brevemente a continuación:

- **Anisakidosis gastroalérgica (AGA).** Forma de parasitismo agudo producido por larvas de *A. simplex* en el que se asocian síntomas de hipersensibilidad alérgica mediada por IgE que aparecen tras unas horas de la ingestión de pescado crudo o poco cocinado (Daschner *et al.*, 1998). Estos síntomas pueden incluir urticaria aguda, angioedema o anafilaxia.
- **Urticaria crónica asociada a sensibilización a *A. simplex* (UC+).** Cuadro alérgico en respuesta a la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex* en el organismo. Puede prolongarse hasta ocho semanas, o incluso más.

Ambos cuadros son el resultado de una respuesta inmune mediada por anticuerpos IgE específicos anti-*A. simplex*, ante la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex* en el organismo. Ahora bien, el caso de *A. simplex* es especial, pues es un nematodo parásito y no un alimento. Dicho de otro modo, los mecanismos responsables de desencadenar la respuesta alérgica son más complejos que la de los alérgenos alimentarios, no quedando claro si para el inicio de dicha respuesta es necesaria la presencia de la larva viva o muerta. Este debate se planteó por vez primera en el año 2002 por Audicana *et al.*, y se profundizará más adelante, en el apartado de *Anisakis* y alergia”.

2.1.5. Otras patologías

Además de las manifestaciones previamente descritas, la infección por *Anisakis* se ha relacionado con:

- **Lesión aguda de la mucosa gástrica.** Se caracteriza por la aparición de ulceraciones, erosiones y hemorragias en la mucosa gástrica. Otras etiologías pueden ser postoperatorios de intervenciones quirúrgicas, endoscopia o alcohol, entre otros (Ishikura *et al.*, 1993)
- **Asociación con tumores.** Se ha descrito el posible papel de las L3 de *A. simplex* como posible cofactor del cáncer gástrico (Petithory *et al.*, 1990; Ishikura *et al.*, 1969; Gutiérrez y Cuéllar, 2002). Esto podría explicarse por la lesión granulomatosa que origina la larva que, en el caso de cronificarse, estará asociada a una elevada proliferación (Moore y Tsuda, 1998) y con el paso del tiempo degenera en un tumor (Totsuka, 1974).

2.2. Anisakidosis y alergia

La alergia *A. simplex* fue descrita por primera vez en Japón en 1990 (Kasuya *et al.*, 1990), pero el auge de las publicaciones en el campo de la alergia frente a dicho parásito se inició tras la descripción en España de nuevos casos de anafilaxia inducida por *A. simplex* en 1995 (Audicana *et al.*, 1995). Se demostró que los pacientes con síntomas alérgicos agudos tras el consumo de pescado parasitado mostraban IgE específica frente a este nematodo parásito. Desde entonces se le ha considerado como un potencial alérgeno y muchas investigaciones se han llevado a cabo siguiendo un protocolo clásico de alergia a alimentos, empezando por la detección y caracterización de alérgenos (Daschner *et al.*, 2012).

Así mismo, de acuerdo con la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), *A. simplex* es considerado como el único parásito de los productos de la pesca implicado en reacciones alérgicas, incluyéndose también como factor etiológico en las directrices para la evaluación de la anafilaxia (Simons, 2011).

Por otro lado, son numerosas las publicaciones científicas que señalan *a priori* la alergia a *Anisakis* como si se tratara de un alérgeno alimentario, tratando incluso de implicarlo como causa de alergia ocupacional (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Vidacek *et al.*, 2010; López y Pardo, 2010; Mossali *et al.*, 2010; Nieuwenhuizen *et al.*, 2006; Añibarro y Seoane, 1998; Armentia *et al.*, 1998; Barbuzza *et al.*, 2009).

Sin embargo, el debate sobre si las L3 de *Anisakis* deben de estar vivas para producir los síntomas alérgicos continúa aún hoy abierto. Por ello resulta de vital importancia analizar la relación existente entre los parásitos y las alergias, de tal manera que podamos mejorar nuestra comprensión de la alergia a *Anisakis*, así como el papel de la IgE en esta parasitosis. Esto permitirá profundizar también en las definiciones de alérgeno y alérgeno principal en el campo de la parasitología (Daschner *et al.*, 2012).

2.2.1. Antígenos y alérgenos de *Anisakis*

Un antígeno es una sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune con formación de anticuerpos, mientras que un alérgeno es un antígeno que produce una reacción clínica, que se traduce en una respuesta de hipersensibilidad (Brasó y Jorro, 2003). Los alérgenos se asocian a anticuerpos sensibilizantes, que son con mayor frecuencia de la clase IgE, y que se encuentran previamente fijados en la superficie de mastocitos o basófilos, liberándose, tras la unión antígeno-anticuerpo, sustancias mediadoras de la inflamación y dando lugar así a los síntomas alérgicos (Taylor, 2006).

A. simplex es capaz de producir una respuesta inmunológica durante la infección en el ser humano. Los antígenos responsables que se han identificado hasta el momento se dividen, en función de su origen, en somáticos, de excreción-secreción y de superficie (Olivares Ponce, 2013).

- **Antígenos somáticos.** Son las proteínas mayoritarias en los nematodos y suelen estar implicadas en el metabolismo (Valls *et al.*, 2005). Se obtienen por homogenización de las larvas enteras y contienen todas las proteínas solubles del parásito.
- **Antígenos de excreción-secreción (ES).** Son sintetizados en la glándula esofágica dorsal y en las células secretoras del tracto digestivo del nematodo y son liberadas al medio durante la infección, siendo los anticuerpos frente a estos antígenos los primeros en aparecer (Iglesias *et al.*, 1993; Valls *et al.*, 2003). Además presentan actividad enzimática (proteolítica e hialuronidasa) (Perteguer *et al.*, 1996) y, por tanto, facilitan la penetración del parásito en la mucosa gástrica.
- **Antígenos de superficie.** La cutícula de los nematodos está formada principalmente por colágeno, sobre el que se sitúan proteínas hidrofóbicas con alto potencial antigénico. Dado que se expresan tras la transición interlarvaria (de L3 a L4), se ha sugerido que, probablemente, estos antígenos sean menos específicos que los anteriores (Valls *et al.*, 2005). Sin embargo, podrían tener cierta importancia en las respuestas inmunes a largo plazo ocasionadas por los granulomas eosinofílicos que rodean los restos cuticulares del nematodo al morir la larva (Baeza *et al.*, 2001).

Por otro lado estarían los alérgenos de *Anisakis*, los cuales ocasionan una respuesta de hipersensibilidad mediada por la IgE a distintas proteínas alergénicas del parásito que se asocian a los productos de *excreción-secreción* o a proteínas somáticas de las larvas de anisákidos (Moneo *et al.*, 2000b).

Tabla 4. Alérgenos caracterizados de *Anisakis simplex*.

| | kDa | Función | Positividad | Referencia |
|----------|-----|-----------------------------------|-------------|---|
| Ani s 1 | 24 | Inhibidor de tripsina tipo Kunitz | 85% | Moneo <i>et al.</i> , 2000 |
| Ani s 2 | 97 | Paramiosina | 88% | Pérez-Pérez <i>et al.</i> , 2000 |
| Ani s 3 | 41 | Tropomiosina | 4% | Asturias <i>et al.</i> , 2000 |
| Ani s 4 | 9 | Cistatina | 27% | Rodríguez-Mahillo <i>et al.</i> , 2007 |
| Ani s 5 | 15 | Proteína SXP/RAL-2 | 25-49% | Kobayashi <i>et al.</i> , 2007 |
| Ani s 6 | 7 | Serpina | 18% | Kobayashi <i>et al.</i> , 2007 |
| Ani s 7 | 139 | Glicoproteína | 83-100% | Anadón <i>et al.</i> , 2010 |
| Ani s 8 | 15 | Proteína SXP/RAL-2 | 25% | Kobayashi <i>et al.</i> , 2007 |
| Ani s 9 | 14 | Proteína SXP/RAL-2 | 13% | Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2008 |
| Ani s 10 | 21 | Proteína con función desconocida | 39% | Caballero <i>et al.</i> , 2011 |
| Ani s 11 | 27 | Proteína con función desconocida | 47% | Kobayashi <i>et al.</i> , 2011 |
| Ani s 12 | 31 | Proteína con función desconocida | 57% | Kobayashi <i>et al.</i> , 2011 |
| Ani s 13 | 37 | Hemoglobina | 64-81% | González-Fernández <i>et al.</i> , 2015 |
| Ani s 14 | 24 | Proteína con función desconocida | 53% | Kobayashi <i>et al.</i> , 2015 |

Con el fin de poder realizar un diagnóstico específico, tanto de la anisakidosis como de la alergia a *Anisakis*, desde el año 2000 se vienen realizando estudios sobre el aislamiento molecular y caracterización de los alérgenos de la L3 de *A. simplex*. Aunque en la actualidad solo se han identificado 14 alérgenos, Arlian *et al.* (2003) han reportado la existencia de al menos 18 diferentes alérgenos de *A. simplex*, sugiriendo la existencia de un número indefinido de alérgenos aún no identificados. Los principales alérgenos de *Anisakis* y sus características principales se muestran en la Tabla 4.

2.2.2. Papel de la IgE anti-*Anisakis* en la reacción alérgica

La IgE es un anticuerpo que se produce dentro de un contexto de respuesta tipo Th2 que puede ser desencadenada por la presencia de un alérgeno o bien de un parásito.

Los alérgenos implicados pueden ser alimentarios (leche de vaca, cacahuete), ambientales (polen) o, en definitiva, cualquier molécula que al entrar en contacto con el sistema inmunitario lo sensibilice produciendo anticuerpos IgE específicos, que se unen a los receptores de alta afinidad FcεRI de los mastocitos, y que en sucesivos contactos provoque los síntomas típicos de la hipersensibilidad de Tipo I (Shakib *et al.*, 2008).

Respecto a la respuesta parasitaria, está aceptado desde hace tiempo que la respuesta de tipo IgE frente a helmintos es universal en los mamíferos y que es el resultado de la interacción de dichos helmintos con el sistema inmunológico a lo largo de la evolución. Así, los primeros datos de la colonización por helmintos se han descrito a lo largo de la historia filogenética de los vertebrados. La primera evidencia de citocinas Th2 y macrófagos activados alternativamente aparece en los peces óseos. Posteriormente, la colonización de la tierra, probablemente, permitió la invasión de los primitivos tetrápodos por los nematodos parásitos para que, finalmente, la IgE fue adquirida por los mamíferos (Jackson *et al.*, 2009).

Por tanto, no debería ser correcto aplicar los fundamentos de la alergia al campo de la parasitología. En primer lugar, no existe consenso en cuanto a la definición de alérgeno. En segundo lugar, si bien todas las definiciones están de acuerdo en que un alérgeno es un antígeno capaz de producir anticuerpos IgE, no todas aceptan incluir como necesario un estado atópico de base para responder con una reacción de hipersensibilidad. Y en tercer lugar, ninguna de esas definiciones especifica que un alérgeno tenga que ser un antígeno no parasitario (Goldsby *et al.*, 2003), y es por ello por lo que la mayoría de las investigaciones en torno *A. simplex* se han llevado a cabo siguiendo protocolos clásicos de estudio de alérgenos alimentarios.

En relación con lo indicado, hay producción de IgE tanto en las alergias alimentarias como en la anisakidosis alérgica. Es importante destacar que esta IgE específica se produce siempre, incluso en pacientes sin síntomas de alergia clínicamente evidentes (Asaishi *et al.*, 1980). Esto se puede comprobar fácilmente mediante la detección de la IgE específica producida con el *Skin Prick Test* (SPT), o midiendo IgE en el suero de los pacientes (Daschner *et al.*, 2001). Por el contrario, el dolor epigástrico característico de

los AGA solo se ha correlacionado con la reacción alérgica propiamente dicha (Ashaishi *et al.*, 1980).

El modelo que se propone para explicar la sensibilización temprana en la anisakidosis es el siguiente:

1. Tras la ingestión de la L3 viva de *A. simplex*, esta penetra la mucosa gastro-intestinal liberando antígenos larvarios que el sistema inmunitario reconoce, originando una respuesta de tipo Th2. Consecuentemente, se produce IgE específica frente a los productos de excreción-secreción, así como frente a los antígenos de superficie o somáticos.
2. La IgE quedará distribuida por el organismo como IgE circulante, o IgE unida al receptor de alta afinidad FcεRI de los mastocitos localizados en las submucosas o la piel. El sistema inmunitario queda, por tanto, sensibilizado.
3. En caso de que se den nuevos contactos, la L3 viva penetrará de nuevo el epitelio gástrico ayudándose de las proteasas y de otros productos de excreción-secreción. Estos factores ayudarán a migrar a la larva, facilitando, además, su evasión del sistema inmunitario. Además, la generación masiva de productos de excreción-secreción podría anular la acción protectora de la IgA secretora propia de las mucosas. De este modo, algunos de estos productos de excreción-secreción alcanzan las moléculas de IgE ancladas en los mastocitos, produciendo el entrecruzamiento de las moléculas de los receptores FcεRI y, consecuentemente, su degranulación y la liberación de histamina, además de otros mediadores.
4. Todo ello dará lugar a una reacción inflamatoria local en los casos de anisakidosis gástrica, que, en el caso de la AGA, podrán acompañarse de síntomas alérgicos (urticaria, anafilaxia). Además, en determinados individuos, en concreto aquellos que no llegan a manifestar estos síntomas agudos, puede llegar a desarrollarse una UC asociada a la sensibilización al parásito (UC+) (Figura 7).

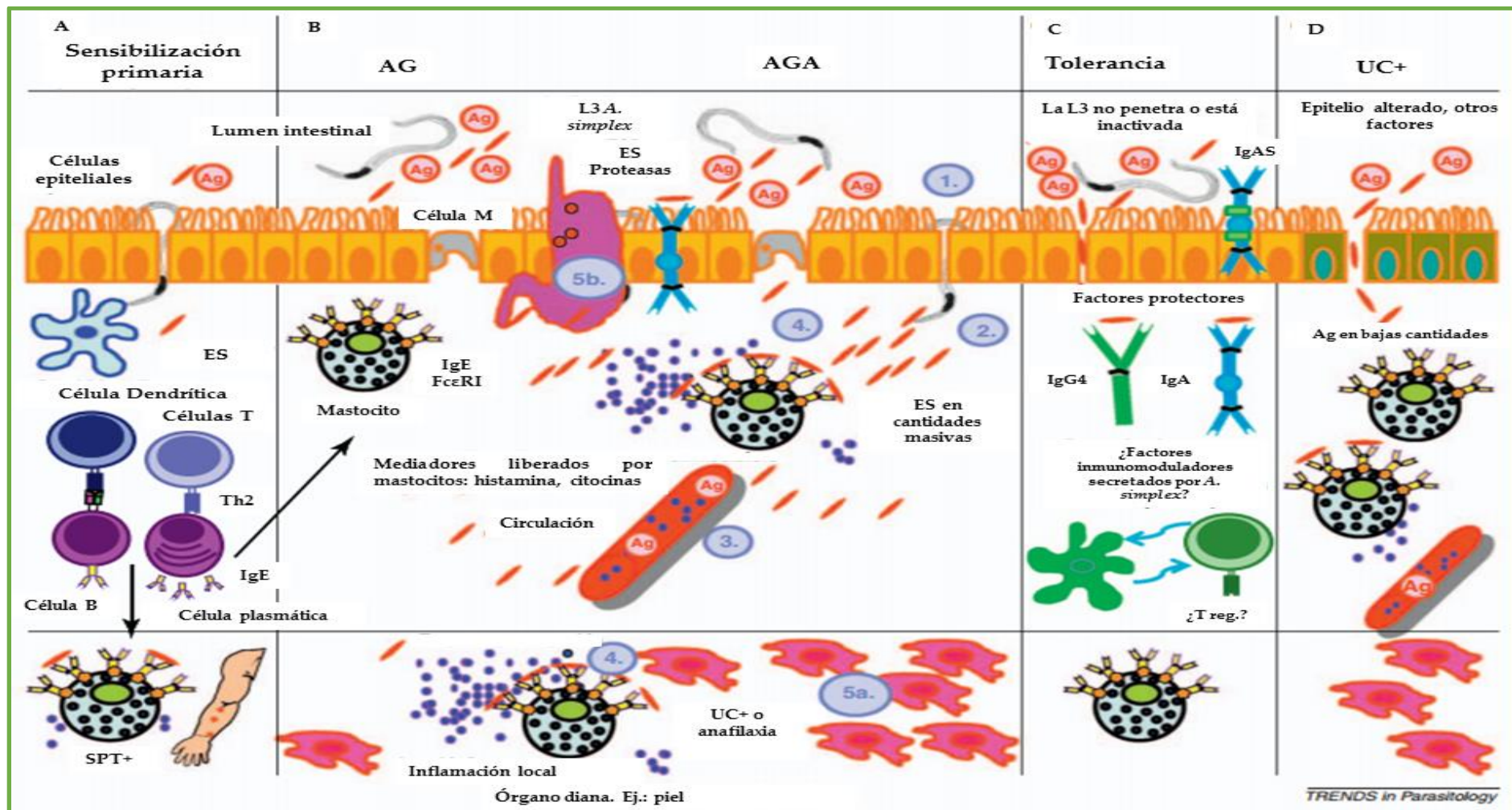


Figura 7. *Anisakis simplex*, vivo, inactivado, o sus alérgenos. (A) Sensibilización primaria. (B) Anisakiosis gástrica y gastroalérgica. (C) Tolerancia. (D) Urticaria crónica por sensibilización a *A. simplex*. Abreviaturas: AG, anisakiosis gástrica; AGA, anisakiosis gastroalérgica; ES, productos de excreción-secreción; Ag, antígenos de *A. simplex*; FcεRI, receptor de alta afinidad por IgE; SPT+, SPT positivo; T_{reg}, células T reguladoras; UC+, urticaria crónica por sensibilización a *A. simplex* (Daschner et al., 2012).

Tal y como se puede apreciar en la Figura 7, la sensibilización primaria tiene lugar cuando la larva L3 viva de *A. simplex* penetra la mucosa gastrointestinal, liberando a su paso los productos de excreción-secreción (ES) así como los antígenos somáticos o de superficie de *A. simplex*. Esto inducirá una respuesta de tipo Th2 con producción de IgE específica circulante y, al mismo tiempo, capaz de unirse a sus receptores de alta afinidad, FcεRI, en la membrana de los mastocitos localizados en la submucosa gastrointestinal, y otros órganos como la piel. Los *Prick Test* positivos demuestran la existencia de mastocitos sensibilizados tras un primer contacto con la larva L3 viva de *A. simplex* en la piel.

Después, tras la sensibilización primaria, en el caso de que se produzcan nuevos contactos con la larva L3 viva de *A. simplex*, esta penetra el epitelio gástrico (1), liberando proteasas y otros productos que la permiten migrar a través del epitelio y evitar en parte los mecanismos de defensa del sistema inmunitario del hospedador. En función de la cantidad de antígenos ES expulsados por el parásito, así como los niveles de IgA o IgG4 producidos por el hospedador, estos antígenos accederán a la submucosa (2) y de ahí a la circulación, alcanzando otros órganos diana, como la piel (3,5). Algunos de estos productos son alérgenos, que se unen a la IgE que ceba los mastocitos, ocasionando la degranulación y la liberación de histamina, y otros mediadores como citocinas (4). Se desencadenan así una serie de eventos que terminan en el desarrollo de los síntomas alérgicos, tales como la urticaria o la anafilaxia (anisakiosis gastroalérgica, AGA) (5a), o bien, en el caso de la anisakiosis gástrica, a una inflamación local (5b).

Por otro lado, también puede darse el caso contrario, la usencia de síntomas. Esto podría estar relacionado con mecanismos de tolerancia, bien porque la larva L3 viva de *A. simplex* no penetra la mucosa gástrica, o bien ella o sus antígenos son inactivados en el lumen gástrico por factores protectores que impiden que los mastocitos sensibilizados entren en contacto con los alérgenos de *A. simplex*. Entre estos factores protectores se podrían incluir la IgA secretora o circulante, así como IgG4, que competirían por su unión a los alérgenos. También podrían estar implicados otros mecanismos inmunomoduladores secretados por *A. simplex*. Además, la liberación de bajos niveles de alérgenos por parte de la larva podría no ser suficientes para generar síntomas clínicos. A diferencia de lo que ocurre en las alergias alimentarias, en el caso de la anisakiosis no es necesario que el epitelio se encuentre dañado (van Egmond *et al.*, 2001). Es más bien la larva viva la responsable de la alteración de este.

Por último, la sensibilización por *Anisakis* se ha relacionado con UC. Los mecanismos implicados aún no están claros, pero los bajos niveles o la ausencia de IgG4 o IgA secretora, así como la alteración del epitelio de la mucosa, podrían favorecer el contacto de los alérgenos de *A. simplex* con los mastocitos de la submucosa, aun cuando estos alérgenos se encuentren en muy bajas cantidades, produciendo una urticaria prolongada en el tiempo (Daschner *et al.*, 2012).

Según esto, los síntomas de alergia aguda tienen lugar solo en el contexto de un parasitismo activo, permitiendo que los productos de excreción-secreción entren en contacto con la sub-mucosa. A este respecto, a pesar de que se han descrito casos de

reacciones alérgicas tras consumo de pescado siguiendo las adecuadas normas de prevención y cocinado, es decir, se han atribuido al contacto con alérgenos procedentes de L3 de *Anisakis* no viables (Audicana y Kennedy, 2008), no existen datos que hayan demostrado resultados positivos en pruebas de provocación empleando material procedente de larvas de *A. simplex* no viables.

En los pacientes con AGA, las pruebas de provocación realizadas con larvas muertas de *A. simplex* han sido siempre negativas. No solo eso, sino que estudios posteriores en los que se realizaron pruebas de provocación empleando productos de excreción-secreción larvarios para asegurar la presencia de los productos clínicamente relevantes procedentes de las larvas vivas, tampoco se encontró reacción positiva alguna (Alonso *et al.*, 1999; Daschner *et al.*, 2000; 2001; Sastre *et al.*, 2000; Baeza *et al.*, 2004).

Así mismo, son varios los estudios que han demostrado que los síntomas agudos alérgicos, como urticaria, angioedema o anafilaxia, únicamente tienen lugar cuando las L3 vivas de *A. simplex* parasitan el tracto gastro-intestinal causando AGA (Alonso *et al.*, 1997; Daschner *et al.*, 2000). Por tanto, el desarrollo de un cuadro de AGA implicaría un parasitismo previo por *A. simplex*, lo que confirma que las larvas deben ser ingeridas vivas para producir los síntomas asociados a la parasitación y, en su caso, la reacción de hipersensibilidad de tipo I asociada a la misma.

Por otro lado, está el hecho de que la IgE no es el único isotipo de inmunoglobulina que se produce ante la parasitación por *A. simplex*. También se pueden detectar IgG, IgG4, IgA e IgM frente a *A. simplex* en el suero de pacientes con AGA (Daschner *et al.*, 2002). Este fenómeno explicaría, entre otras cosas, el hecho de que a pesar de que casi el 100% de los pacientes con AGA presentan anticuerpos IgE frente a *Anisakis*, todos toleren la ingesta de pescado bien cocinado (Cuéllar *et al.*, 2012). Se ha sugerido que la IgA o IgG4 podrían competir con los mastocitos sensibilizados de la sub-mucosa y otros órganos diana por los alérgenos, funcionando como factores protectores (Daschner *et al.*, 2012).

No sería la primera vez que la IgG4 específica se ha asociado con la protección, incluso cuando la IgE específica está presente. Daschner *et al.* (2014), describieron que los valores de IgG4 fueron superiores en pacientes con AGA en comparación con los pacientes con UC asociada a sensibilización a *Anisakis*, del mismo modo que los valores de IgE. Además, se calculó el cociente entre IgG4/IgE frente a *Anisakis* 7, *Anisakis* 1 y el antígeno larvario y resultó ser significativamente superior en los pacientes con AGA en el caso de *Anisakis* 7. De esta manera, se confirmó que la IgG4 anti-*Anisakis* 7, además de ser un factor de protección, es un marcador independiente de AGA.

Además de la respuesta policlonal, los niveles y la avidéz de la IgE específica varían en función del tiempo y de la frecuencia de consumo de pescado. Por un lado, los niveles de IgE específica aumentan a lo largo del primer mes tras el último contacto, para después descender lentamente. Y por otro, los estudios mediante *western-blot* demuestran que se producen nuevas especificidades de la IgE, aumentando el reconocimiento de proteínas sobre los extractos crudos larvarios, así como sobre los productos de excreción-secreción (Daschner *et al.*, 2002).

Por último, observaron que la avidéz de la IgG era significativamente mayor, mientras que la avidéz por la IgE disminuyó en pacientes con AGA en comparación con los pacientes con urticaria crónica (UC), observándose correlación negativa entre los niveles de IgE y los valores de avidéz de esta inmunoglobulina. En los pacientes con AGA se determinó una correlación negativa de la avidéz de la IgE con el tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas y correlación positiva con la frecuencia de consumo de pescado (Cuéllar *et al.*, 2013).

En conclusión, la anisakidosis se puede considerar una entidad intermedia entre la alergia y el parasitismo (Daschner *et al.*, 2012).

2.2.3. Reconocimiento de los alérgenos principales de *Anisakis simplex*

Los alérgenos de *A. simplex* se mostraron previamente en la Tabla 3. Sin embargo, para ser considerados alérgenos principales se deben considerar una serie de factores relacionados con el tiempo transcurrido entre el episodio gastroalérgico y el análisis del suero. Así, en estudios realizados con los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 se han observado descensos de hasta casi un 90% en los niveles de IgE específica detectada por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), tras uno o dos años de seguimiento (Anadón *et al.*, 2010).

Además, si aplicamos los fundamentos de la alergia a la parasitología, un alérgeno principal es aquel que es reconocido por más del 50% de los pacientes sensibilizados frente a *Anisakis* (Daschner *et al.*, 2012). Según esto, el primer alérgeno principal que se describió fue Ani s 1. Sin embargo, se comporta como tal solo después de un episodio de AGA, dado que en el caso de UC+ pasa de un reconocimiento del 80% a un 42%. Por el contrario, Ani s 7 es reconocido por más del 90% de los individuos sensibilizados, tanto después de un episodio de AGA como de un episodio de UC asociada a la sensibilización por *Anisakis*. De este modo, la determinación de Ani s 7 pone de relieve la existencia de un contacto parasitario anterior en casi la totalidad de los pacientes diagnosticados de UC asociada a sensibilización a *Anisakis* (Cuéllar *et al.*, 2012).

Por otro lado, recientemente se ha considerado un nuevo alérgeno principal, la hemoglobina de *Anisakis*, denominada Ani s 13. Para ello, González-Fernández *et al.*, (2015) determinaron los anticuerpos de isotipos IgE e IgG4 frente a la hemoglobina de *A. simplex* y frente a la de *Ascaris* en sueros de pacientes sensibilizados a *Anisakis*. El 63,4% de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* presentó IgE específica a la hemoglobina de *Anisakis* y, por tanto, puede ser considerada un alérgeno principal. Además, al realizar el análisis por separado, se vio que el 80,9% de los sueros del grupo de pacientes con AGA fueron positivos, frente a un 47,8% de los pacientes con UC. En cuanto a la IgG4, el 31,8% de los individuos sensibilizados resultaron positivos (47,6% en AGA y 17,3% en UC). Todo esto deja ver que existe una respuesta claramente diferenciada entre las dos entidades clínicas alérgicas asociadas a la parasitación por *Anisakis* (González-Fernández *et al.*, 2015).

Finalmente, conviene destacar que ninguno de los sueros presentó niveles de anticuerpos IgE detectables frente a la hemoglobina de *Ascaris*. Esto podría indicar una ausencia de reacciones cruzadas, y hacer de este alérgeno un potencial candidato para el desarrollo de herramientas diagnósticas más específicas (González-Fernández *et al.*, 2015).

2.3. Diagnóstico de la anisakidosis

El diagnóstico de la anisakidosis es a veces difícil, debido a la amplia variedad de manifestaciones que puede producir a nivel gastrointestinal y que son comunes a una gran variedad de patologías digestivas. Además, en muchas ocasiones, presenta síntomas escasos por lo que no se llegan a realizar las exploraciones adecuadas.

Incluso en los casos más agudos, la enfermedad suele confundirse con diversas patologías como úlceras, apendicitis aguda, obstrucciones intestinales, pólipos de estómago, peritonitis tuberculosa, tumores o enfermedad de Crohn (Oshima, 1972).

A continuación, se describen los distintos tipos de diagnósticos empleados en la actualidad. Normalmente se usan en conjunto, es decir, constituyen distintas metodologías que se complementan entre sí para finalmente confirmar el cuadro de anisakidosis.

2.3.1. Diagnóstico clínico

Dado que los signos y síntomas no son específicos y pueden dar lugar a errores, la anamnesis exhaustiva del paciente debe incluir un interrogatorio sobre la alimentación, haciendo hincapié en los hábitos de consumo de pescado crudo o poco cocinado, y sobre todo la ingesta del mismo en las horas o días previos.

2.3.2. Diagnóstico parasitológico

Consiste en la identificación directa de las larvas. Para ello será necesaria la expulsión espontánea de las mismas tras un vómito o tos, lo cual es poco frecuente (Deardorff *et al.*, 1987) o bien su extracción del paciente. El método de elección es la endoscopia en el caso de anisakidosis gástrica o duodenal, que permite visualizar no solo la larva, sino también la lesión ulcerada (Deardorff *et al.*, 1986). También se han descrito casos de anisakidosis colónica diagnosticada mediante colonoscopia.

2.3.3. Diagnóstico radiológico

Este diagnóstico será de elección en la anisakidosis intestinal en los casos en que la lesión no sea accesible al endoscopio. En los estudios baritados es característico una imagen de defecto filiforme (30 mm de longitud) de depleción de contraste (Matsui *et al.*, 1985). En la tomografía computarizada se puede apreciar el engrosamiento de la mucosa intestinal o gástrica (Lee *et al.*, 2014; Takabayashi *et al.*, 2014; Shibata *et al.*, 2014).

2.3.4. Diagnóstico serológico

Es de gran utilidad para confirmar un diagnóstico de presunción cuando no se han observado las larvas mediante endoscopia o radiología. Para ello se emplea un Fluoenzimoimmunoensayo, CAP-FEIA (Phadia, Uppsala, Sweden), que permite detectar y medir *in vitro* la IgE específica circulante en muestras de sangre humana. Es de gran utilidad junto con la anamnesis, pasado un mes de la aparición de la sintomatología originada por la ingestión de la larva (Daschner *et al.*, 1999). Fue empleado por primera vez por Audicana *et al.* (1995) y, desde entonces, este método ha sido utilizado por numerosos autores (Daschner *et al.*, 2000; García-Palacios *et al.*, 1996; Montoro *et al.*, 1997; Arduzzo *et al.*, 1996; del Pozo *et al.*, 1996).

Ahora bien, recientemente se han identificado nuevos alérgenos de *Anisakis* que confieren no solo una mayor especificidad y sensibilidad a esta prueba, sino que permiten diferenciar aquellos pacientes parasitados con o sin reacción alérgica. Son los siguientes:

- **Anis s 7 y Anis s 1.** Anis s 7 se ha propuesto como marcador de parasitación (Anadón *et al.*, 2010). Ambos son la opción más sensible y específica para el serodiagnóstico de la anisakidosis humana, y permiten diferenciar entre diferentes enfermedades alérgicas asociadas a *A. simplex*, introduciendo la determinación de IgG4 específica como un nuevo marcador de enfermedad (Anadón *et al.*, 2009).
- **Anis s 13.** Es la hemoglobina de *Anisakis*, y recientemente se ha demostrado su alta especificidad, lo que hace de este alérgeno un potencial candidato para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos (González-Fernández *et al.*, 2015).

2.3.5. Pruebas cutáneas

Se incluye en la rutina diagnóstica cuando existe sospecha de alergia a *Anisakis* (Daschner *et al.*, 1999; Montoro *et al.*, 1997; Santaolalla *et al.*, 1997; Domínguez Ortega *et al.*, 2000; Sastre *et al.*, 2000). La más utilizada es el SPT, aunque también existen pruebas intracutáneas que fueron utilizadas por Oshima *et al.* (1972), sin llegar a aplicarse en clínica debido al gran número de reacciones cruzadas con otros nematodos relacionados. La posibilidad de utilizar pruebas cutáneas en el diagnóstico de esta parasitosis se debe a la existencia de la ya mencionada forma alérgica de la

anisakidosis mediada por reacciones de hipersensibilidad de tipo I. Consiste en la administración en la piel del antebrazo del paciente del antígeno a estudiar (suele emplear antígenos totales del parásito), junto con un control positivo de histamina y un control negativo de solución salina.

2.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Porteguer *et al.* (2004) desarrollaron la técnica PCR-RFLP para la identificación especie-específica de anisákidos parásitos humanos independientemente de su estadio evolutivo. La elevada sensibilidad del test y la ausencia de variaciones intraespecíficas confirman la utilidad del ensayo en la identificación de parásitos implicados en la anisakidosis humana incluyendo las larvas procedentes de biopsias.

2.4. Tratamiento de la anisakidosis

No existe un tratamiento farmacológico específico para la anisakidosis humana. La eliminación de las larvas mediante extracción endoscópica es el tratamiento de elección cuando la larva se localiza en un lugar accesible, como la pared del estómago, el duodeno o el colon.

Si la larva no es accesible se puede intentar aplicar un tratamiento sintomático. Los fármacos más empleados son antibióticos, antihistamínicos o corticosteroides (Ramos *et al.*, 2005; Pereira Bueno, 1992). Así mismo, se ha descrito el tratamiento con albendazol (400 mg vía oral dos veces al día durante 3 a 21 días) (Moore *et al.*, 2002; Pacios *et al.*, 2005).

En caso de obstrucción o migración extra-intestinal (hígado, páncreas, mesenterio) será necesaria la intervención quirúrgica con resección del área afectada.

Hay que resaltar que, dado que las larvas no sobreviven durante mucho tiempo en el cuerpo humano, la enfermedad tiene en general un pronóstico bueno y tiende a remitir espontáneamente en las dos primeras semanas de la infección.

2.5. Prevención de la anisakidosis

Las normas necesarias para evitar, tanto la parasitación como posteriores reacciones alérgicas, serían, en esencia, evitar la ingestión de pescados que puedan contener L3 vivas de *Anisakis*.

La normativa establece que todos aquellos productos de pesca que vayan a ser consumidos crudos o prácticamente crudos deberán congelarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C, asegurándose de que alcanza la totalidad del producto, durante un período no inferior a 24 horas o a -35 °C durante al menos 15 horas.

Igualmente, se recomienda congelar los pescados marinados y escabechados y pescados salados si la concentración de sal no alcanza un nivel del 9% mantenido durante 6 semanas. Será obligatorio congelar aquellos productos que, aun cuando vayan a ser cocinados, este procedimiento no asegure temperaturas superiores a 60 °C en toda la pieza, como los productos ahumados en frío (AECOSAN, 2016).

Por tanto, un cocinado que asegure estas condiciones, o en caso de consumir pescado crudo, una congelación previa, serían suficientes para evitar la parasitación por *Anisakis*.

Siguiendo estas recomendaciones se puede evitar que pacientes con AGA tengan que seguir una dieta estricta exenta de pescado, ya que las reacciones de alergia requieren la presencia de larvas vivas. Este sencillo consejo dietético evita que los pacientes previamente diagnosticados de AGA sufran posteriores reacciones alérgicas asociadas a *A. simplex* (Reglamento CE 853/2004; Real Decreto 1420/2006).

Sin embargo, estudios recientes recogidos en el informe oficial del AECOSAN (2016), vuelven a abrir el debate sobre si los pacientes sensibilizados corren riesgo de sufrir nuevos episodios de alergia al consumir pescado, aun cuando empleen métodos de congelación o cocinado que aseguren la muerte de la larva. Así, por ejemplo, tras aplicación de calentamiento en autoclave a 121°C durante 20, 40 y 80 minutos (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2014) sobre larvas de *A. simplex*, se advierte que se conserva la capacidad de activación de basófilos, aunque se reduce el número e intensidad de las bandas detectadas por *immunoblotting* en razón del tiempo de aplicación de calor, sobre todo durante 80 minutos. Así pues, los autores concluyen que algunos antígenos de *A. simplex* mantienen su capacidad de unir IgE y de activar basófilos después de haber sido sometidos a métodos equivalentes a los de conservación y enlatado industrial y podrían representar un riesgo para pacientes sensibilizados. También Ventura *et al.* (2008) realizaron el *prick-test* en pacientes sensibilizados con larvas muertas, cocinadas o congeladas, como antígenos para la realización de la prueba, y un 70% de los pacientes presentó un resultado positivo en la prueba cutánea en *prick*, sugiriendo que las larvas muertas pueden evocar una respuesta inmune. Estas publicaciones abordan la alergenicidad, con reconocimiento de proteínas termoestables del pescado tratado (Moneo *et al.*, 2000) (Fæste *et al.*, 2014) y medida únicamente como detección de alérgenos mayoritariamente *in vitro*, sin que esto suponga necesariamente correlación clínica.

3. *Anisakis* e inmunomodulación

Las L3 son las responsables directas de la patología ocasionada por la infección por anisákidos. Así, al intentar invadir la mucosa gastrointestinal, las L3 provocan la rotura mecánica y enzimática de los tejidos mediante la secreción de potentes enzimas proteolíticas capaces de degradar la matriz extracelular (Sakanari y McKerrow, 1990; Kennedy, 2000). Además, varios estudios que se describirán más adelante, han demostrado que las larvas de *A. simplex* son capaces de modular la dicotomía de la

respuesta inmune del hospedador en su propio beneficio y así dificultar su expulsión del tracto digestivo.

3.1. Inmunopatología

Los mecanismos celulares por los cuales las larvas de *Anisakis* dan lugar a las lesiones típicas de la enfermedad no se conocen con exactitud, si bien es sabido que son dos los principales factores responsables: por un lado, la acción directa de la larva durante la invasión de los tejidos y, por otro, las interacciones complejas que se establecen entre el sistema inmunitario del hospedador y las sustancias liberadas o contenidas en el parásito.

Existen dos teorías que intentan explicar la relación entre las reacciones de hipersensibilidad desarrolladas frente a *Anisakis* y la patología:

- **Teoría del doble golpe o choque.** Sostiene que la anisakidosis puede ser causada por una única larva y, que, la penetración de la larva en la mucosa gástrica o intestinal induce una hipersensibilidad local que se prolongará durante un tiempo. Está basada en varios estudios realizados en conejos en los que se producía hipersensibilidad local tras la infección primaria (Kuipers, 1964), o desarrollaban reacciones graves tras una única infección por el parásito, agravadas por un segundo contacto (Ruitenbergh, 1971).
- **Teoría de la exacerbación.** Defiende que la larva de *Anisakis* es capaz de sobrevivir durante dos o tres semanas tras penetrar la mucosa gastrointestinal del hospedador. A lo largo de este período, aparecerá un granuloma alrededor de la larva en el que se liberarán sus productos metabólicos, produciendo sensibilización. Después muere y los productos de su degradación reaccionarán con el granuloma sensibilizado originando una inflamación local (Kojima *et al.*, 1966).

3.1.1. Invasión de tejidos por las larvas

Como venimos diciendo, los mecanismos bioquímicos empleados por las larvas de *Anisakis* para invadir los tejidos son variados y se han ido dilucidando a lo largo de los últimos años. Ya en los años sesenta algunos autores sugirieron que parte de estos agentes podrían ser los productos de excreción-secreción de la larva viva, así como los productos de degradación de la larva muerta (Hayasaka *et al.*, 1968).

Así, el órgano excretor de la larva de *Anisakis* presenta varias enzimas (fosfatasa, fosforilasa, aminopeptidasa, esterasa) responsables de la lisis de los tejidos en la infección (Ruitenbergh *et al.*, 1971). También se han descrito la presencia de proteasas en los productos de excreción-secreción de *Anisakis*, una de las cuales tiene una actividad similar a la tripsina (Matthews, 1982; Sakanari y McKerrow, 1990). Estos factores las dotan de capacidad para degradar la mayor parte de los tejidos gastrointestinales (colágeno) y avanzar a través de la mucosa y la submucosa gastrointestinal.

Por otro lado, Hotez *et al.* (1994) purificaron una sustancia secretada *in vitro* por las larvas de *Anisakis* que tenía capacidad para degradar glicosaminoglicanos, ácido hialurónico y condroitín sulfato. Esta actividad tipo hialuronidasa podría participar también en la invasión e histólisis de la mucosa en la patogénesis de la anisakidosis.

Una vez la larva ha penetrado en la mucosa gastrointestinal, comienza a formarse el granuloma a su alrededor. Esta lesión inflamatoria local está compuesta, entre otros, por eosinófilos y macrófagos.

La leucocitosis eosinofílica con formación de granuloma es una característica similar de muchas infecciones por helmintos en el ser humano y en los animales (Smith y Wooten, 1975). Se cree que esta respuesta puede estar provocada, al menos en parte, por la liberación por las larvas de *Anisakis* de un factor quimiotáctico para los eosinófilos (pero no para los neutrófilos) (Tanaka y Torisu, 1978). Esta molécula es capaz de producir reacciones eosinofílicas flemonosas sin necesidad de una inmunización previa (Iwasaki y Torisu, 1982). Para comprobar dicha actividad *in vivo*, Torisu *et al.* (1981) inocularon este factor quimiotáctico de eosinófilos en el estómago e íleon de conejos, confirmando así su participación en la lesión flemonosa eosinofílica.

Los eosinófilos se unen a las L3 y degranulan su contenido sobre ellas; sin embargo, no son capaces de alterar su cutícula (Deardorff *et al.*, 1991) y, por tanto, no consiguen destruirla. Por su parte, los macrófagos sí ocasionan alteraciones en la cutícula, lo que sugiere que los efectos citotóxicos que dan lugar a la destrucción de la L3 son debidos a los macrófagos. Las larvas de *Anisakis* no presentan la habilidad de desprender de su epicutícula estas sustancias adheridas. Por el contrario, las larvas de *Toxocara canis* sí presentan esta capacidad, lo que las permite evadir la respuesta inmune y migrar a través de los tejidos del hospedador (Badley *et al.*, 1987). Por tanto, esta incapacidad de las larvas de *Anisakis* podría contribuir a su destrucción de manera indirecta.

También se ha descrito la formación de una “capa de cohesión” formada por las propias larvas de *A. simplex* dentro del granuloma. Esta “capa de cohesión” podría presentar naturaleza inmunogénica capaz de prolongar la respuesta inflamatoria característica de la anisakidosis crónica, en la que la larva no se detecta o, incluso, después de la extracción quirúrgica de la misma (Bier y Raybourne, 1987).

Otros mecanismos que las larvas de *Anisakis* han desarrollado para modular la respuesta inmune del hospedador son:

- Acción anticoagulante y antiagregante plaquetaria de los productos de excreción-secreción y de los extractos totales. Prolongan el tiempo de protrombina y de cefalina del plasma humano. Esto juega un papel importante durante la invasión de la mucosa gástrica o intestinal con significación biológica en los pacientes infectados. Un ejemplo es la serpina ANISERP de *A. simplex*, que presenta actividad inhibitoria de la trombina mediante un mecanismo similar al ejercido por la anti-trombina II humana. (Perteguer *et al.*, 1996; Valdivieso *et al.*, 2015).

- Inhibición de la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos (Cuéllar y Perteguer, 1998). Por tanto, podrían estar interviniendo en la supresión de las respuestas Th1.
- Potencial anti-inflamatorio por la presencia de moléculas tipo-IL-4 en los productos de excreción-secreción, así como, en el extracto crudo de *A. simplex* (Cuéllar *et al.*, 2001).
- Actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento (García-Hernández *et al.*, 2007; 2009; 2012).
- Los productos de excreción-secreción presentan capacidad inhibidora sobre la proliferación de linfocitos T y B estimulados por un mitógeno (Raybourne *et al.*, 1983).

Por último, Raybourne *et al.* (1986) plantearon la cuestión de si la cantidad de productos de excreción-secreción producidos por una sola larva sería suficiente para dar lugar a los efectos anteriormente descritos. Observaron que las sustancias producidas durante la invasión de la mucosa gástrica eran reconocidas como antígenos por el hospedador, siendo aparentemente significativa la cantidad de productos de excreción-secreción producidos *in vitro* por una sola larva.

3.1.2. Perfil de anticuerpos

El parasitismo por *A. simplex*, como ya se ha explicado previamente, da lugar a una respuesta policlonal dinámica (Daschner *et al.*, 2002). Se van a producir distintos isotipos de anticuerpos (Daschner *et al.*, 2012), entre los que destacan:

- **IgG4 e IgA.** Ambos son considerados anticuerpos protectores, tanto frente al antígeno total (CE) como frente a los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7, pues compiten con la IgE que ceba los mastocitos por la unión a estos antígenos. Así, los niveles de IgG4 e IgA son siempre superiores en el grupo de AGA al compararlos con los de pacientes con UC asociada a sensibilización a *Anisakis*. Además, el cociente IgG4/IgE para Ani s 7 resulta muy superior en AGA, lo que sugiere un papel inductor de protección para este alérgeno (Daschner *et al.*, 2014). En modelos experimentales de infección oral con larvas de *A. simplex* en ratones, los niveles de IgA desarrollados frente a ES o CE fueron muy bajos, en comparación con el resto de isotipos determinados (Perteguer y Cuéllar, 2001).
- **IgG1 e IgG2.** Se han determinado en estudios experimentales realizados en ratones de laboratorio inmunizados frente a *A. simplex*, y su presencia sugiere una activación tanto de células Th1 como Th2, aun cuando predomine la respuesta Th2 con producción de IL-4 (Perteguer y Cuéllar, 2001). La IgG1 murina, se ha descrito en respuesta a sensibilización a los antígenos larvarios de *A. simplex* por vía subcutánea, dentro de una respuesta Th2 con producción de IL-4 (Slack, 1987; Nieuwenhuizen *et al.*, 2009). Su producción está relacionada con la IL-4, que la amplifica y da lugar a una mayor respuesta de IgG1 específica (Perteguer y Cuéllar, 1998; Cuéllar *et al.*, 1997).

Además, es sabido que la IgG1 murina es equivalente a la IgG4 humana, ambas relacionadas con la respuesta de tipo Th2 y de carácter protector. Por otro lado, la IgG2a se ha relacionado en ratones C57BL/6 con respuestas Th1 (Slack, 1987; Aalberse *et al.*, 2009). Estos resultados se reafirman con el estudio realizado también en ratones por Baeza *et al.* (2005), llegando a conclusiones similares.

- **IgE.** Para el caso concreto de la producción de IgE específica frente a *Anisakis* ya se ha dedicado un apartado completo previamente. Tan solo recordar que es producida en todos los casos en los que se haya dado el parasitismo por las L3 vivas de *Anisakis*, se desarrolle o no una patología alérgica. Así mismo, las especificidades son muy variables entre los pacientes, observándose inmunorreconocimiento de diferentes antígenos mediante *western-blot*, así como el tipo de respuesta que se produce tras el contacto con las larvas vivas de *A. simplex* (Daschner *et al.*, 2001).

3.1.3. Perfil de citocinas

El parasitismo por *Anisakis* en el ser humano es agudo o intermitente, pues no es su hospedador natural. Por este motivo, sería de esperar que *Anisakis* careciera de las características inmunorreguladoras típicas de las helmintosis crónicas, causando por ello siempre enfermedad (Daschner y Cuéllar 2010). Sin embargo, el estudio del balance de citocinas pro/antiinflamatorias en pacientes diagnosticados previamente de parasitación por larvas de *A. simplex*, tanto en muestras de suero como en sobrenadantes de cultivos de linfocitos aislados de sangre periférica, dio lugar a resultados que señalan lo contrario (Daschner *et al.*, 2011; 2013).

Al investigar los niveles de citocinas en sueros resultó que el contacto previo con los antígenos liberados por las larvas vivas de *A. simplex* se asoció con un incremento de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β , con valores significativamente más altos en los casos de AGA en comparación con los pacientes con UC sensibilizados a *Anisakis*. Esto sugiere que el contacto continuado con antígenos del parásito, a través de la ingestión de pescado parasitado con larvas vivas, podría estar mimetizando los efectos moduladores de los parasitismos crónicos en individuos genéticamente predispuestos (Daschner *et al.*, 2011; 2013).

En este sentido, el fenotipo AGA produce una respuesta anti-inflamatoria mayor que el de la UC asociada a sensibilización a *Anisakis*, en el cual se producen más citocinas pro-inflamatorias (Cuéllar *et al.*, 2012). Además, el aumento de IL-10 estuvo asociado con la mejoría de los síntomas en los pacientes con UC asociada a sensibilización a *Anisakis*. Por el contrario, no se observó mejoría en los pacientes que hicieron dieta exenta de pescado, lo que reduciría el contacto con antígenos derivados de las larvas (Daschner *et al.*, 2013).

3.1.4. Co-infecciones de *Anisakis* con otros patógenos

Dentro de la capacidad de modular el sistema inmunitario por los helmintos, resulta de especial interés cómo se vería afectada dicha regulación cuando las infecciones sean

concomitantes a otros patógenos o en el caso de poliparasitismos. En esta situación, los diferentes parásitos podrían inducir diferentes respuestas, potenciándose o antagonizándose. Así, un protozoo puede polarizar la respuesta hacia un fenotipo Th1, mientras que un helminto induciría un fenotipo Th2 o regulador. Así, la coexistencia de tales parásitos en el mismo hospedador podría en conjunto terminar influenciando las respuestas inmunológicas frente a las distintas especies, afectando la resistencia, la susceptibilidad y las manifestaciones clínicas (Supali *et al.*, 2010).

Los estudios realizados en esta línea en relación al parasitismo por *A. simplex* se han llevado a cabo analizando la coexistencia con la infección por *Toxoplasma gondii*, protozoo que presenta una elevadísima prevalencia en población asintomática, produciendo infecciones crónicas y que, al igual que *Anisakis*, está asociado con determinadas costumbres dietéticas. Fernández-Fígares *et al.* (2015) analizaron la relación entre ambos agentes en la UC, observándose que *T. gondii* no tiene ningún efecto protector ni sobre la atopía en general ni sobre la sensibilización a *Anisakis*. Además, se encontró un sinergismo entre ambos parásitos, con potenciación de la UC, cuando se presenta una asociación de la infección crónica por *Toxoplasma* con un parasitismo previo por *Anisakis*.

En este mismo estudio también se determinaron los niveles de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* e IgE anti-*Anisakis*. Los pacientes con UC asociada a sensibilización por *Anisakis* presentaron una mayor prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma*, lo cual podría indicar que los niveles de anticuerpos IgE anti-*A. simplex* se ven potenciados por la presencia de *T. gondii*. Este hecho demuestra que la respuesta Th1 inducida por *T. gondii* es incapaz de inhibir la respuesta Th2 asociada a la parasitación por *A. simplex*.

Por último, se estableció una asociación significativa entre la presencia de IgG anti-*T. gondii* y atopía, considerándose la presencia de IgG anti-*T. gondii* como factor de riesgo para presentar atopía en pacientes con UC (Fernández-Fígares *et al.*, 2015).

3.2. Linfocitos T

3.2.1. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (T_{reg}) son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa inhibiendo la activación del sistema inmunológico, permitiendo el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia de lo propio.

El interés sobre los T_{reg} ha aumentado por las evidencias encontradas en modelos experimentales murinos, que demuestran que el potencial inmunosupresor de estas células puede manipularse terapéuticamente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Tang y Bluestone, 2006) y facilitar la tolerancia frente a trasplantes (Waldmann *et al.*, 2006), pudiendo también ser eliminadas específicamente para potenciar la inmunoterapia frente al cáncer (Beyer y Schultze, 2006).

Por tanto, las células T_{reg} son esenciales, no solo en la tolerancia y mantenimiento de la homeostasis, sino también para mantener un equilibrio cuando se producen respuestas inflamatorias, evitando que éstas sean excesivas o para asegurar su finalización.

Linfocitos T CD4+ reguladores

Fueron descritos por vez primera en 1995 por Sakaguchi *et al.*, quien demostró que la existencia de células CD4+ procedentes del timo, que expresaban altos niveles de la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), eran capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos T efectoras. Con el tiempo, se han ido describiendo distintas subpoblaciones. Las dos principales, las cuales difieren en su origen y en el modo en el que ejercen su actividad supresora, son las siguientes:

- **Células T CD4+ reguladoras naturales (nT_{reg}).** Se originan en el timo, aunque actualmente se acepta que también están implicados en respuestas inmunológicas periféricas (Suvas y Rouse, 2006), y constituyen el 5%- 10% de todos los linfocitos T CD4+ (Sakaguchi *et al.*, 2000). Se ha postulado que las principales señales que necesitan para su maduración son la señalización intensa de su TRC, seguido del aumento en la expresión de CD25 y generando así células más receptivas a la IL-12, encargada a su vez de mantener la expresión de Foxp3 y CD25 (Lio *et al.*, 2008). Así, el marcador más ampliamente reconocido y empleado es la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25) (Sakaguchi *et al.*, 2001). Además, en ratones se ha visto que Foxp3 se expresa intracelularmente casi exclusivamente en nT_{reg}, mientras que en humanos también se expresa en los linfocitos T generados extratímicamente (Fehervari y Sakaguchi, 2004). Una de las funciones de Foxp3, tanto en ratones como en humanos, es regular negativamente la activación de los linfocitos T efectoras, probablemente a través de la supresión de citocinas como IL-2 (Hori y Sakaguchi, 2004). De este modo, los nT_{reg} se caracterizan por su capacidad para suprimir la proliferación celular e inhibir la producción de citocinas proinflamatorias de los linfocitos T efectoras. Además, se ha visto que pueden controlar la proliferación de las células NK, la maduración de las CDs y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B (Miyara, *et al.*, 2007).

Su activación es antígeno-específica a través del TCR (Thornton *et al.*, 2007), y una vez activados, ejercen su acción de forma independiente a la especificidad antigénica de las células diana (Thornton y Shevach, 2000). Es probable que las células nT_{reg} supriman las respuestas inmunológicas en múltiples pasos, los cuales pueden incluir señales negativas producidas por moléculas de superficie de los nT_{reg}, muerte por citotoxicidad, modulación a la baja de las células presentadoras de antígeno (CPA), inducción de otras células reguladoras, así como otra serie de interacciones célula-célula (Aristimuño Villamayor, 2008).

- **Células T CD4+ reguladoras inducidas (iT_{reg}).** Se originan en la periferia, o bien en el contexto de una respuesta inmune normal, o tras entrar en contacto con una CPA, constituyendo un mecanismo esencial en el control y mantenimiento de la tolerancia. Se generan, por tanto, tras inducción y en presencia de una serie de factores (citocinas) y microambiente particular, a partir de precursores vírgenes capaces de reconocer

antígenos que no están en el timo, como son los alimentos, y generar tolerancia a ellos. Se dividen en dos subpoblaciones principales:

a) **Células Tr1.** Presentan especificidad para una gran variedad de antígenos, incluidos los antígenos propios, y se pueden localizar en la mucosa intestinal (Cottrez y Groux, 2004; Roncarolo *et al.*, 2001). Se conciben tras estimulación repetida de su TCR en presencia de IL-10. Se caracterizan por producir grandes cantidades de esta citocina inmunosupresora, y en menor proporción, TGF- β (Roncarolo *et al.*, 2006). *In vitro* inhiben la proliferación de células T CD4⁺ y suprimen la producción de anticuerpos por los linfocitos B (Kitani *et al.*, 2000). *In vivo* se han relacionado con la supervivencia del injerto en individuos trasplantados (Holler *et al.*, 2000; VanBuskirk *et al.*, 2000).

Al contrario de los nT_{reg}, no expresan elevados niveles de Foxp3 o CD25 en su superficie y no realizan la supresión por contacto celular directo (Berthelot y Murgas, 2004). Sin embargo, Grossman *et al.* (2004) demostraron que sí presentan actividad citotóxica induciendo apoptosis en la célula diana por medio de granzima A y perforina, de forma dependiente de CD8.

b) **Células Th3.** Se identificaron como resultado de estudios de tolerancia oral (Weiner, 2001). Se han descrito en la mucosa intestinal de ratones y humanos. Por tanto, se encuentra localizadas en el tejido linfoide del sistema gastrointestinal. Se caracterizan por producir principalmente TGF- β y, en menor medida, IL-10. Esto ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Miller *et al.*, 1992). Sin embargo, se desconocen los mecanismos inductores de su aparición.

La liberación de grandes cantidades de TGF- β suprime la proliferación de células Th1 y Th2. Además, se ha visto que los Th3 son capaces de inducir la expresión de IgA por las células plasmáticas (Weiner, 2001; Zheng *et al.*, 2002).

- **Células T reguladoras Foxp3⁺ inducidas.** Presentan características fenotípicas y funcionales muy similares a las células T reguladoras naturales, pero se generan en la periferia y no en el timo (Suto *et al.*, 2002). Sin embargo, existe controversia sobre sus funciones, pues no siempre se ha encontrado una correlación entre la expresión de Foxp3 y su actividad reguladora (Prado Cueto, 2012).

En resumen, las células T reguladoras naturales e inducidas se diferencian en su mecanismo de acción. Así, las células naturales necesitan de un contacto directo a través de su TLR, mientras que las inducidas van a actuar mediante la producción de grandes cantidades de citocinas supresoras (IL-10 y TGF- β), con la excepción de las células T reguladoras inducidas que actuarán también mediante contacto directo (Prado Cueto, 2012). En la Figura 8 se muestran los distintos tipos de linfocitos CD4⁺ originados en el timo, así como las citocinas que participan en su diferenciación y sus principales funciones.

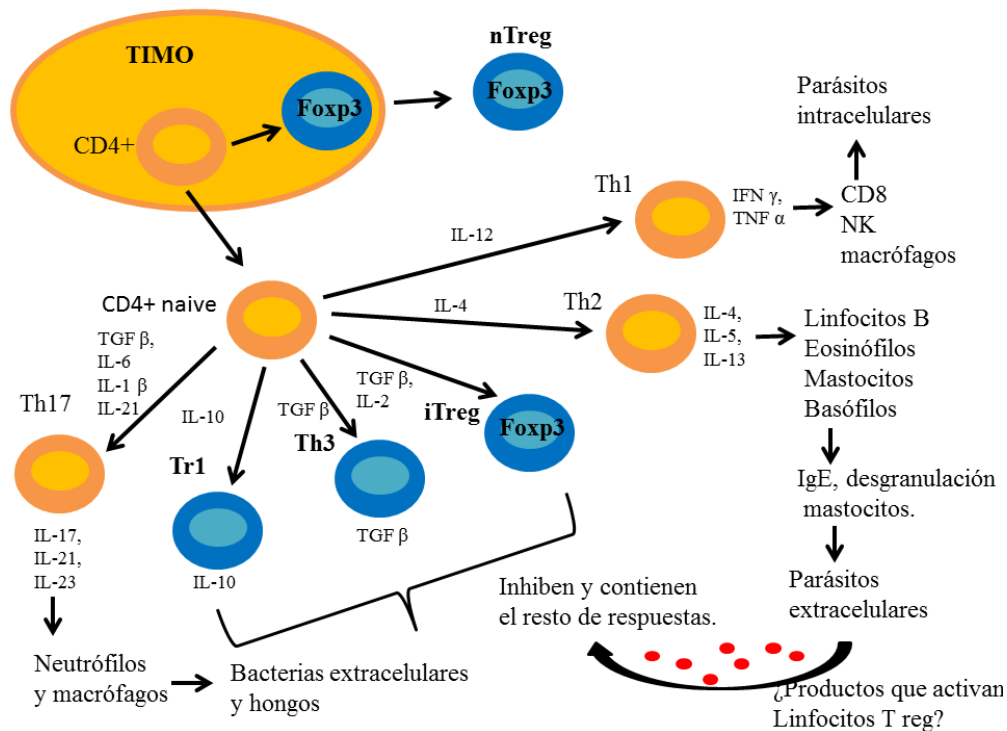


Figura 8. Subpoblaciones de linfocitos CD4+ de origen central (timo) en función del microambiente de citocinas en el que se activen. Modificado a partir de Prado Cueto, 2012.

Linfocitos T CD8+ reguladoras

Previamente al descubrimiento de las células T CD4+ reguladoras, la primera subpoblación que se identificó con propiedades reguladoras fue la de células T CD8+, viendo que podían ser inducidas *in vitro* y diferenciadas en células supresoras capaces de suprimir a las células T CD4+ activadas tras la interacción con el antígeno (Stanton *et al.*, 1978; Eardley *et al.*, 1978).

Tras varios estudios, se han definido varias poblaciones de células T CD8+ reguladoras, todos ellos basados en la capacidad de la molécula Qa-1 (MHC-Ib) para presentar péptidos endógenos y exógenos a células T CD8+. Así, se determinó que la supresión mediada por las células T CD8+ se bloqueó con anticuerpos dirigidos frente a Qa-1 (Jiang *et al.*, 1995). Posteriormente el mismo grupo determinó que, además, esta supresión se bloqueaba con anticuerpos anti-TCR, anti-CD8 y con anticuerpos frente a MHC-Ib, pero no por anticuerpos frente a MHC-Ia. Así, se ha sugerido que el complejo formado por la molécula Qa-1-autopéptido expresado por las células T CD4+ podría disparar la expresión del TCR en células T CD8+. Estas, a su vez, se diferenciarían en supresoras y actuarían sobre las células T CD4+, que expresan el mismo complejo péptido-Qa-1 (Jiang y Chess, 2000).

Por otro lado, los estudios realizados con células T CD8+ humanas han sugerido que HLA-E, el homólogo humano de Qa-1, presenta una función similar a ésta (Li *et al.*, 2001).

Posteriormente, dentro de la subpoblación de células T CD8⁺ se identificó a una población CD28⁻ capaz de interactuar de forma directa con CDs y convertirlas en tolerogénicas. Estas CPA presentaban una expresión reducida de moléculas coestimuladoras y no inducían una respuesta antígeno-específica de las células T CD4⁺ (Najafian *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2002). Estas células CD8⁺ son CD28⁻ y expresan el ARNm de Foxp3. La exposición de monocitos y CPA a esta subpoblación de células T_{reg} también llevó a una expresión elevada de genes que codifican ILT3 e ILT4, miembros de la familia del receptor inhibitor de células *natural killer* (NK) (Chang *et al.*, 2002). La expresión de estos motivos está asociada con la inhibición de la activación del factor nuclear NF- κ B y con una menor expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las CPA. De este modo, se ha postulado que las T_{reg} CD8⁺CD28⁻ restringidas a moléculas MHC de clase I, que presentan un antígeno específico, en primer lugar, inducirían CDs tolerogénicas que expresarían *immunoglobulin-like transcrip* (ILT), generando, a su vez, células T_{reg} CD4⁺ (Vlad *et al.*, 2005).

Por último, por analogía con las células Tr1, se ha demostrado una subpoblación de células T CD8⁺ cuyos efectos supresores son mediados por la IL-10 (Gilliet y Liu, 2002). También se demostró que la generación de estas células T_{reg} CD8⁺ era dependiente de IL-10. Estudios en humanos han demostrado que estas células podían ser inducidas por las CDs plasmocitoides, y, una vez activadas, producir IL-10, que suprimiría las respuestas de las células T CD4⁺ específicas de antígeno (Wei *et al.*, 2005). Además, solo en ratón se ha descrito una subpoblación similar, pero que se caracteriza por la expresión en su superficie de la cadena beta de los receptores de la IL-2 e IL-5 (CD122) (Rifa'i *et al.*, 2004).

3.2.2. Linfocitos T $\gamma\delta$

Desde el descubrimiento de un nuevo tipo de receptor en los linfocitos T (TCR- $\gamma\delta$ receptor) (Saito y Tonegawa, 1984), estos han sido clasificados en dos grupos principales: linfocitos T $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$) y linfocitos T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) (Figura 9).

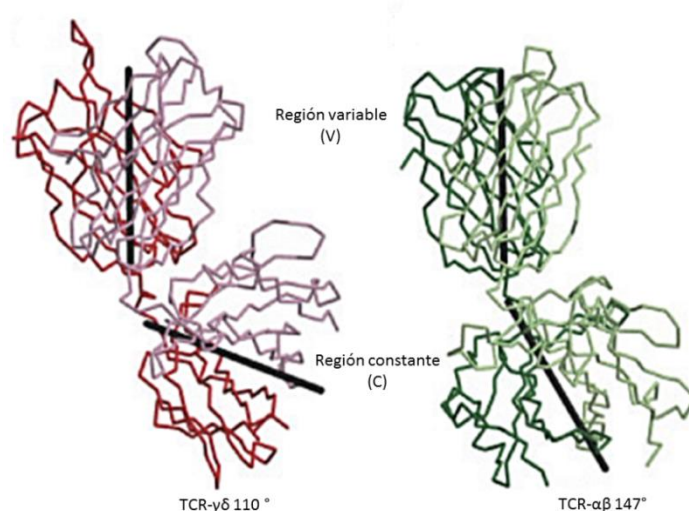


Figura 9. Estructura de los receptores humanos TCR- $\gamma\delta$ y TCR- $\alpha\beta$ (Allison *et al.*, 2001).

A partir de este momento, los $LT\gamma\delta$ se han estudiado en profundidad, desvelándose poco a poco sus funciones en el sistema inmune. Sin embargo, aún hoy son poco conocidos en comparación con los $LT\alpha\beta$. No obstante, se les considera una pieza clave en la primera línea de defensa contra la invasión de patógeno, especialmente en los epitelios y mucosas, así como en la homeostasis de la respuesta inmune (Zheng *et al.*, 2013). Esto en parte, es debido a que, mientras que el 90%-95% de los linfocitos situados en sangre periférica son $LT\alpha\beta$ y, solo un 5%-10% $LT\gamma\delta$ entre todas las células T $CD3+$, más del 50% de los linfocitos intraepiteliales son $LT\gamma\delta$ (Goodman y Lefrancois, 1988).

Los $LT\gamma\delta$ se originan en el timo, donde seguirán un proceso de diferenciación y selección. Durante este proceso siguen un camino similar al de los $LT\alpha\beta$ y, de hecho, se ha comprobado que existe un precursor común que da lugar a ambas poblaciones. Los $LT\gamma\delta$ maduros van a ser fundamentalmente dobles negativos, $CD4-$ y $CD8-$ (Dudley *et al.*, 1995).

Como ya se ha comentado, una vez finalizada su maduración, migran del timo hacia la periferia, situándose principalmente en epitelios y mucosas (Goodman y Lefrancois, 1988), donde van a ejercer sus funciones. A continuación se exponen las funciones atribuidas a los $LT\gamma\delta$:

- **Reconocimiento de proteínas sin procesamiento antigénico por el MHC.** Esta clase de linfocitos no son capaces de reconocer péptidos procesados por las CPA (Schild *et al.*, 1994). Por tanto, presentan una respuesta rápida contra agentes microbianos en la primera línea de defensa mediante el reconocimiento de fosfoantígenos, lípidos y proteínas no procesadas por el MHC (Chien *et al.*, 2014).
- **Acción citotóxica directa.** Son capaces de provocar la apoptosis de células infectadas o tumorales mediante la secreción de perforinas y granzima B (Qin *et al.*, 2009), independientemente de anticuerpos (Alexander *et al.*, 2008). Incluso se ha visto que pueden opsonizar y fagocitar células infectadas (Benet Campos, 2015). También participan en la secreción de citocinas proinflamatorias como $IFN-\gamma$ o $TNF-\alpha$, potenciando una respuesta $Th1$ frente a bacterias o virus, o bien $IL-17$ para la respuesta a hongos (Tsuji *et al.*, 1994).
- **Activación de la respuesta inmune.** Siempre a nivel local, pueden promover la maduración de las CDs, así como la activación de macrófagos y células NK (*Natural Killers*) (Wands *et al.*, 2005). Además, son capaces de aumentar la capacidad de resistencia a la invasión de las células epiteliales (Jameson y Havran, 2007).
- **Regulación y estimulación de la inmunidad innata.** Se ha visto que son capaces de ejercer regulación sobre otras células de la respuesta inmune innata mediante la producción de citocinas inmunosupresoras como el $TGF-\beta$ y la $IL-10$ (Bonnevillie *et al.*, 2010). Además, pueden colaborar con los linfocitos B en la producción de anticuerpos mediante la producción de CXCR5 (*CXC chemokine receptor 5*) (Schaerli *et al.*, 2000) y regular la actividad de los $LT\alpha\beta$ (Hayday *et al.*, 2003).

- **Células presentadoras de antígeno.** Resulta una función poco común en linfocitos T, pero se ha demostrado su capacidad para procesar y presentar antígenos patógenos a otras células inmunitarias, como los propios LT $\alpha\beta$ (Brandes *et al.*, 2009). No solo eso, si no que participan en la regeneración epitelial y la curación de heridas. Se ha visto que pueden estimular la síntesis de ácido hialurónico por las células epiteliales mediante la producción de factores de crecimiento epitelial como el *insulin-like growth factor* (IGF-1), o el *keratinocyte growth factor* 1 y 2 (KGF-1, KGF-2) (Jameson y Havran, 2007).

En conclusión, los LT $\gamma\delta$ presentan funciones relacionadas tanto con la inmunidad adquirida (inherente a su TCR) como con la inmunidad innata. Es por esto que pueden ser consideradas como una célula puente entre ambas respuestas (Kabelitz, 2011).

Estas características específicas de los LT $\gamma\delta$ han multiplicado los estudios en las últimas dos décadas tratando de dilucidar su papel de defensa ante las infecciones, como anti-tumorales y como reguladores de la respuesta inmunitaria en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunitarias (Bonneville, 2010; Vantourout, 2013).

Linfocitos $\gamma\delta$ y sepsis

La evidencia científica de que la inmunosupresión presenta un papel esencial en la sepsis es cada vez mayor. La respuesta inmunitaria inicial en la sepsis es hiperinflamatoria (tormenta de citocinas). Seguida, rápida y progresivamente, por una respuesta hipoinflamatoria (inmunosupresión) (Hotchkiss *et al.*, 2013). Así, esta disfunción inmune podría dar lugar a una mayor susceptibilidad del individuo a infecciones secundarias oportunistas (Otto *et al.*, 2001), o la reactivación de infecciones latentes (Luyt *et al.*, 2007; Limaye *et al.*, 2008).

Estudios recientes han demostrado que la inmunosupresión en la sepsis reduce tanto los LT $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$, siendo los LT $\gamma\delta$ los que presentan el mayor descenso en su población, que se ve agudizado a medida que aumenta la severidad del proceso séptico. Andreu-Ballester *et al.* (2013) asociaron la mortalidad por septicemia con el descenso significativo de los LT $\gamma\delta$. Posteriormente, demostraron una mayor expresión de IgE frente al agente oportunista *Encephalitozoon cuniculi* en los pacientes sépticos, que, a su vez, se relacionó con un descenso en los niveles de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en sangre periférica (Andreu-Ballester *et al.*, 2014).

A la vista de los antecedentes expuestos, sería interesante el estudio de la relación entre los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en pacientes sépticos con los niveles de linfocitos T y B. Dado el potencial papel inmunosupresor de los antígenos larvarios de *A. simplex*, este podría suponer un descenso de las poblaciones de LT $\gamma\delta$ tras un contacto previo con el parásito.

3.2.3. Linfocitos T *Natural Killers* (NKT)

Las células NKT lo forman un grupo heterogéneo de linfocitos T no convencionales que participan tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Se ha visto que co-expresan receptores característicos de células NK y de linfocitos T clásicos, lectina-*C* NK1.1 y el receptor TCR, respectivamente (Godfrey *et al.*, 2004). Las células NKT reconocen antígenos presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad Ib (CD1d). A diferencia del resto de células T que reconocen antígenos (péptidos) presentados por las MHC de la vía clásica, las células NKT reconocen antígenos lipídicos (glicolípidos, glicerol) (Bendelac *et al.*, 2007; Taniguchi *et al.*, 2003). Aún cuando originariamente se las describió como células T capaces de expresar marcadores característicos de células NK, posteriormente se descubrió que la expresión de estos marcadores no se daba en todas las poblaciones de NKT (Godfrey *et al.*, 2004). Se han definido al menos dos tipos de células NKT:

- **Células NKT, tipo I.** También denominadas células NKT “invariantes” o iNKT, presentan un receptor TCR- $\alpha\beta$ con un repertorio muy limitado. Con este receptor, reconocen antígenos de carácter glicolipídico, como α -galactosilceramida. Se dividen en dos grupos en función de la expresión de CD4 y CD8. En ratones, aproximadamente el 90% son CD4+, el resto lo forman células NKT doble negativas CD4-CD8-. En humanos, además hay un grupo que expresa CD8 $\alpha\alpha$, pero su función es aún desconocida (Terabe y Berzofsky, 2014).
- **Células NKT, tipo II o “no invariantes”.** A diferencia de las de tipo I, no son capaces de reconocer la α -galactosilceramida, aunque si otros lípidos. También se han dividido en dos grupos: CD4+ y CD4- CD8-. Recientemente se ha reportado que algunos LT $\gamma\delta$ son capaces de reconocer antígenos a través de CD1d, y por tanto, estos LT $\gamma\delta$ pueden ser considerados parte de estas células NKT tipo II (Bai *et al.*, 2012).

A diferencia de los linfocitos T CD4+ convencionales, los distintos tipos de células NKT no se pueden interconvertir entre ellos. Así mismo, mientras que dentro de los linfocitos T convencionales distintas subpoblaciones pueden tener la misma especificidad, en el caso de las células NKT cada tipo, I o II, reconocerá antígenos diferentes. Esto facilita en gran parte el estudio de las células NKT *in vivo*, dado que con la administración de un antígeno concreto, solo se activará una clase de NKT (Terabe y Berzofsky, 2014).

Por otro lado, la especificidad del receptor TCR de las células NKT no es tan restringida como la de los linfocitos T clásicos. Así, al menos en el caso de las células NKT de tipo I, un mismo TCR es capaz de reconocer antígenos con estructuras diversas. Aún cuando la proporción de células NKT (aproximadamente un 1% de las de tipo I en el bazo de ratón) es considerablemente inferior en comparación con el total de linfocitos T convencionales (30%/10% de linfocitos T CD4+/CD8+, respectivamente, en bazo de ratón), un 1% del total de células en el bazo con la misma especificidad antigénica, supone una frecuencia extremadamente elevada. Según esto, no es de extrañar que las células NKT jueguen un papel crucial en la regulación del sistema inmunitario (Terabe y Berzofsky, 2014).

La estimulación, tanto *in vivo* como *in vitro* de células iNKT en presencia de α -galactosilceramida, da lugar a la producción de grandes cantidades de la citocina inmunomoduladora IFN- γ , así como de citocinas características de la respuesta tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) y citocinas antiinflamatorias (IL-10) (Godfrey *et al.*, 2004). Todo ello, en conjunto, regula o amplifica la respuesta innata y adaptativa influenciando la función de las CDs, linfocitos B y T, y células NK (Kronenberg, 2005). Sin embargo, excepto en presencia de un agonista potente como es la α -galactosilceramida, se ha visto que función del microambiente reinante, la concentración de antígenos de carácter lipídico y el tipo de CPA con las que interaccionen, las iNKT son capaces de orientar la respuesta inmunitaria a través de la liberación de citocinas concretas. De este modo se ha descrito su implicación, *in vivo*, en procesos autoinmunitarios, inflamatorios, resistencia a tumores y en procesos infecciosos (Godfrey *et al.*, 2004; Tupin *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, tras 24 de infección con el nematodo *Brugia pahangi* en ratones, ocasionó una expansión de NKT en bazo y ganglios linfáticos, así como la producción de IL-4 principalmente por el subtipo de NKT CD4-, lo cual podría ser responsable de la polarización hacia una respuesta inmunitaria tipo Th2 (Balmer y Devaney, 2002). Por el contrario, Koyama (2002) observó que la depleción de células que expresaban NK1.1 no originó cambios en el desarrollo de la respuesta tipo Th2 durante la infección gastrointestinal por el nematodo *Trichuris muris*.

Por tanto, a pesar de que aún la literatura es limitada y es necesario una mayor investigación que nos permita determinar su modo de activación así como sus funciones reguladoras, las células NKT se presentan como posibles inmunorreguladoras, con un papel en patología crónicas (Faveeuw *et al.*, 2008).

3.2.4. Interacción entre los antígenos de *Anisakis* y los linfocitos T

La mayoría de los patógenos entran en nuestro organismo a través de las membranas mucosas, siendo el intestino uno de los principales sistemas. Por ello no es de extrañar que entre el 80% y el 85% de las células inmunocompetentes se concentren en el tejido linfoide asociado al intestino (Brandtzaeg, 1998), donde los LT $\gamma\delta$ van a ser particularmente importantes.

En la anisakiosis existe la posibilidad de que los productos larvarios de *Anisakis* Actúen como mediadores de inmunosupresión, dado que pueden interaccionar, de forma directa, con las CDs de la mucosa intestinal, las cuales podrían producir señales tolerogénicas capaces de inducir cambios en las poblaciones de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

En modelos experimentales murinos de anisakiosis, puestos a punto previamente en nuestro laboratorio, se han observado respuestas diferentes dependiendo de las cepas utilizadas (Perteguer y Cuéllar, 1998), observándose un comportamiento susceptible en BALB/c y resistente en C57BL/6. Posteriormente, se estudió en la cepa susceptible (BALB/c) el efecto de la inmunización con los antígenos de *A. simplex*, previa a la inoculación de una larva por vía oral. El análisis histológico reveló las lesiones gástricas y/o intestinales más prominentes en aquellos animales que no habían sido

inmunizados con los antígenos larvarios de *A. simplex* previamente a la inoculación oral con una larva. De hecho, estos procesos inflamatorios se vieron inhibidos por dicha inyección antigénica previa, observándose, así mismo, una reducción del número de linfocitos CD4+ y CD8+. Paralelamente, se observó que CE indujo una inhibición de la proliferación *in vitro* de linfocitos T (Perteguer y Cuéllar, 2001). Park *et al.* (2009) comprobaron también que *A. simplex* produce un homólogo del factor inhibidor de la migración de macrófagos capaz de suprimir las respuestas Th2 en un modelo de asma alérgica mediante el reclutamiento de linfocitos T CD4+CD25+Foxp3+.

Por último, sería de interés analizar el papel de los antígenos larvarios de las larvas de *Anisakis* sobre la producción de CDs heterogénicas capaces de inducir la expansión de T_{reg} funcionales *in vitro* e *in vivo*.

3.3. Linfocitos B reguladores

Desde hace tiempo se sabe que la producción de anticuerpos constituye la principal función de los linfocitos B. Además, son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T, así como de secretar citocinas, siendo reguladores positivos de la función inmunitaria. Sin embargo, en 2002 se describió una nueva población de linfocitos B, caracterizada por la secreción de IL-10 y TGF- β mayoritariamente (Fillatreau *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2014b).

Así, según las señales que reciban, los linfocitos B pueden producir citocinas pro o antiinflamatorias (Vadasz *et al.*, 2013). Estos linfocitos B han sido denominados linfocitos B reguladores (B_{reg}), los cuales deprimen la respuesta inmune, con función descrita en trasplantes, cáncer e inflamación, fundamentalmente mediada por IL-10 (Ding *et al.*, 2015). También se encargan de regular el balance de Th1, Th17 y T_{reg}, mediante la secreción de citocinas supresoras como la IL-10 pueden convertir los linfocitos T efectores en linfocitos Tr1 (Sun *et al.*, 2015). Sin embargo, no se han encontrado aún marcadores adecuados para definir y diferenciar con exactitud esta población, los más empleados actualmente son CD19+ y CD25+, pero es necesaria la búsqueda de marcadores más específicos (Xu *et al.*, 2014).

Por último, estudios realizados en ratones han determinado que los B_{reg} pueden secretar otras citocinas inhibitorias, además de IL-10 y TGF- β , como son IL-33 e IL-35 (Sattler *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014), demostrando así que los B_{reg} pueden ejercer su función supresora a través de otras citocinas (Gil Borrás, 2015).

3.4. Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son las células profesionales por excelencia como presentadoras de antígeno. Se encuentran distribuidas por todo el organismo, dando lugar a distintas subpoblaciones específicas de cada tejido. En los últimos años se ha asentado su papel como puente imprescindible y esencial entre la respuesta innata y

adaptativa. Son, al mismo tiempo, inductoras de la respuesta inflamatoria contra patógenos y responsables de generar tolerancia tanto central como periférica (Sun *et al.*, 2015).

De este modo, forman un grupo ampliamente heterogéneo que tiene su origen en los progenitores de la médula ósea CD34+. Estos, a su vez, originan una línea mieloide que, por un lado, dará lugar a las células dendríticas clásicas (cCD) y, por otro, a una línea linfóide de la que derivan las células dendríticas plasmacitoides (pCD). Las primeras migrarán principalmente al timo, y se encargarán de la tolerancia central, y las segundas a los tejidos linfoides y participarán en la tolerancia periférica. Se deduce por tanto que las CDs van a estar localizadas en aquellos lugares donde se va a producir con mayor probabilidad la invasión por los patógenos, además del contacto con sustancias externas como los alimentos (Chun Yuen *et al.*, 2013).

Por tanto, las CDs van a actuar a modo de centinelas. En primer lugar, reconocerán con sus Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRP) el antígeno extraño y lo procesarán y presentarán a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I y II en su superficie. Para llevar a cabo dicha presentación antigénica migrarán a los ganglios linfáticos y realizarán una “sinapsis inmunológica” con los linfocitos T (Chun Yuen *et al.*, 2013).

Así, en función del microambiente en el que las CDs hayan reconocido y procesado el antígeno correspondiente, estas madurarán hacia un fenotipo pro-inflamatorio o hacia uno regulador y, consecuentemente, provocarán una respuesta diferente sobre los linfocitos T, según el caso. La “sinapsis inmunológica” establecida entre la CDs y el linfocito T va a requerir, como mínimo, de tres señales para causar una activación del linfocito T (Hivroz *et al.*, 2012):

1. Reconocimiento del complejo antígeno-MHC por el TCR del linfocito T.
2. Las señales de co-estimulación son imprescindibles. Se debe dar la unión de CD80/CD86 de la superficie de la CDs con el marcador CD28 del linfocito T.
3. Liberación de citocinas. La IL-12 inducirá linfocitos Th1 efectoras; IL-4, IL-5 e IL-13 promoverán linfocitos Th2 efectoras (Dorner *et al.*, 2009), y, por último, TGF- β en presencia de IL-1 e IL-6 originará linfocitos Th17 (Kasper *et al.*, 2010).

Por el contrario, como mecanismo de defensa en la tolerancia central y periférica, las CDs pueden promover la tolerancia inmunológica frente a un antígeno determinado mediante inducción de anergia en los linfocitos T, generación de linfocitos T reguladores, inhibición de las respuestas generadas por linfocitos T efectoras o bien provocando la apoptosis de los linfocitos T (Manicassamy y Pulendran *et al.*, 2011). Esto lo realizan disminuyendo la expresión del complejo antígeno-MHC, así como de las moléculas co-estimuladoras, y liberando al medio grandes cantidades de citocinas inmunosupresoras, principalmente IL-10 y TGF- β (Liu y Cao, 2015).

Independientemente del mecanismo, la capacidad de las CDs para modular las respuestas de los linfocitos T es importante, indudablemente, para discriminar

antígenos propios y no propios asociados a mucosas como, por ejemplo, en el intestino. Las CDs son muy abundantes en la mucosa intestinal (*lamina propria*) y en órganos linfoides asociados al intestino, tales como las placas de Peyer. El papel de las CDs de la *lamina propria* consiste en mantener la homeostasis intestinal a través de una interacción compleja con la microbiota comensal, el epitelio intestinal y las células inmunitarias intestinales.

En los últimos años se han caracterizado las diferentes subpoblaciones implicadas en las respuestas inmunológicas y en los fenómenos de tolerancia (Chirido *et al.*, 2005). Según la expresión del marcador de superficie CD103, las CDs intestinales se han dividido en dos tipos fundamentales (Varol *et al.*, 2009):

- Las **CD11c^{high} CD103⁻**. Presentan propiedades antiinflamatorias y están aumentadas en la colitis murina. Inducen los linfocitos Th1 y Th17 (Niess y Adler, 2010).
- Las **CD11c^{high} CD103⁺**. Se caracterizan por ser CDs reguladoras en el intestino, facilitando la diferenciación de los T_{reg} e inhibiendo la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y previniendo la inflamación intestinal (Kayama *et al.*, 2012).

La existencia de CDs tolerogénicas, y su interacción con las T_{reg}, ha sido descrita previamente utilizando CDs procedentes de diferentes mucosas (no solo la intestinal). Sin embargo, los resultados podrían no ser extrapolables, dado que las CDs de diferentes órganos y localizaciones, a pesar de presentar fenotipos similares, pueden tener diferentes funciones (Pulendran *et al.*, 1999).

Por este motivo, dada la localización intestinal de la larva de *A. simplex*, en esta introducción nos hemos centrado en describir los datos existentes sobre la población de CDs específicas de la mucosa intestinal, localizadas principalmente en la *lamina propria* de la mucosa, lugar donde con mayor probabilidad se van a depositar los antígenos larvarios de *A. simplex*.

Además de las dos poblaciones descritas, estudios anteriores describieron la existencia de una población de CDs equivalente a las CDs plasmocitoides (pCD), tanto en ratones como en humanos. Las pCD son una subpoblación especial de origen linfoide que presenta morfología de célula plasmática y produce elevados niveles de interferones de tipo 1. También se vio que las pCD juegan un importante papel en la inducción de tolerancia periférica mediante la modulación de la función de los linfocitos T efectores CD4⁺ y CD8⁺ induciendo la diferenciación de los linfocitos T vírgenes en T_{reg} (Martín *et al.*, 2002).

3.4.1. *Anisakis* y células dendríticas

En los casos de anisakidosis, la larva es capaz de sobrevivir durante un periodo comprendido entre dos y tres semanas tras penetrar la submucosa digestiva del hospedador. Transcurridos de seis a diez días tras la penetración de la larva, comienza

a desarrollarse un granuloma a su alrededor. Los productos metabólicos de la larva aún viva sensibilizarán al hospedador al entrar en contacto con los componentes del granuloma. Tras la muerte de la larva, su cutícula se degrada y desintegra, y las células y exudados liberados por el parásito reaccionan de forma directa con el granuloma ya sensibilizado, dando lugar a una inflamación en torno a la larva muerta. Los antígenos liberados por la larva muerta son capturados y transportados por las CDs de la mucosa a través de los vasos linfáticos. A su vez, estas CDs podrían haber sido previamente sensibilizadas por el material liberado por la larva viva, dando lugar al inicio de la típica respuesta inmunitaria secundaria tras la ingestión oral de los parásitos, la cual incluye activación de neutrófilos, macrófagos de los tejidos implicados, monocitos, CDs, basófilos y eosinófilos (Jones *et al.*, 1990).

Existen trabajos que demuestran que determinadas CDs de la mucosa (fenotípicamente similares a las pCD) inducen diferenciación de novo de células T_{reg} a nivel intestinal (Martín *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 1996). De este modo, teniendo en cuenta la localización de las larvas en la anisakidosis intestinal, resulta lógico pensar que los antígenos larvarios de *A. simplex* se depositan directamente sobre la *lamina propria* siendo inmediatamente capturados por las CDs locales.

Por este motivo, resultaría interesante estudiar el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre *Bone Marrow Derived Dendritic Cells* (BMDDCs) de ratón, modificando la expresión de marcadores de activación celular, citocinas y señalización celular.

4. Helmintos e inmunomodulación

El perfil de distribución mundial actual de enfermedades muestra una elevada frecuencia de infección por parásitos en la población correspondiente a los países en vías de desarrollo, mientras que la población perteneciente a los países desarrollados está sufriendo un incremento en enfermedades relacionadas con alteraciones del sistema inmunitario, como son alergias, autoinmunidad y patologías inflamatorias intestinales crónicas. Este hecho ha planteado la cuestión de si los parásitos, y en concreto los helmintos, además de haber desarrollado estrategias para modular el sistema inmunitario a su favor y así no ser eliminados por su hospedador, han dado lugar a una co-adaptación parásito-hospedador en la que, a lo largo de la co-evolución, dicha asociación ha prevenido reacciones exageradas del sistema inmunitario (Maizels *et al.*, 2016). Desde hace tiempo se sospecha que la elevada prevalencia de atopia y enfermedades alérgicas y autoinmunes del mundo occidental está relacionada con los bajos niveles de infecciones helmínticas más que con diferencias genéticas (Imai y Fujita 2004; Rook, 2007).

Los mecanismos descritos son múltiples. Así, por ejemplo, la capacidad de activación de los linfocitos T se ve disminuida en las filariosis y bilharciosis crónicas, pero se restableció tras el tratamiento correspondiente (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Colley *et al.*, 1986). En otro estudio, se encontró una relación causal entre la infección por *Schistosoma* y la atenuación de alergias en niños atópicos, pues al tratarlos con praziquantel se produjo un empeoramiento de la atopia, lo cual no ocurrió en el grupo

control que recibió placebo (van den Biggelaar *et al.*, 2004). También se han comprobado los efectos beneficiosos de *T. suis* sobre la enfermedad inflamatoria intestinal (Weinstock *et al.*, 2005), de *Necator americanus* en enfermos de Crohn (Croese *et al.*, 2006), así como los efectos preventivos de *S. mansoni*, *H. polygirus* y *T. spiralis* sobre la diabetes tipo 1 (Cooke *et al.*, 1999; Zacccone *et al.*, 2006).

Igualmente, existen evidencias en animales de laboratorio que demuestran la posible prevención de la autoinmunidad mediante el empleo de productos derivados de *S. mansoni* (La Flamme *et al.*, 2003), *T. spiralis* (Khan *et al.*, 2002), *T. suis* (Summers *et al.*, 2003), *H. polygirus* (Elliot *et al.*, 2004) y la filaria *Acanthocheilonema vitae* (McInnes *et al.*, 2003). En este último ejemplo, la glicoproteína ES-62 debe sus efectos moduladores a la fosforilcolina presente también en ascáridos como *A. simplex*. Melendez *et al.* (2007) han demostrado que ES-62 además de inhibir la activación de linfocitos B y T, CDs y macrófagos, es igualmente eficaz frente a mastocitos, los cuales también expresan TLR, por lo que incluso podría prevenir reacciones alérgicas. Harnett *et al.* (2005) demostraron que el receptor de ES-62 es TLR4, receptor natural del lipopolisacárido de la pared bacteriana, siendo intrigantemente innecesario el reconocimiento por parte de TLR2 (Goodrige *et al.*, 2005).

Por tanto, el estudio de las sustancias inmunomoduladoras derivadas de parásitos pueden explicar por qué las infecciones activas por helmintos reducen la eficacia de las vacunas convencionales (Cooper *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2006) y promueven la susceptibilidad frente a infecciones por VIH, malaria o tuberculosis (Fincham *et al.*, 2003) a través de la generación de T_{reg} que podrían ejercer su función local o sistémicamente.

Además, el estudio de los mecanismos por los cuales los parásitos manipulan la respuesta inmune a través de moléculas anti-inflamatorias es de interés no solo por la aplicación directa sobre el desarrollo de estrategias anti-helmínticas, sino también por el desarrollo de nuevos productos anti-inflamatorios para pacientes aquejados de enfermedades inflamatorias, autoinmunes o alérgicas (McKay, 2006; van Riet *et al.*, 2007).

De hecho, en los últimos años se han realizado ensayos en modelos experimentales en los que las infecciones por helmintos se han empleado como tratamiento experimental de desórdenes inflamatorios. Algunos ejemplos son los siguientes: *T. spiralis* dio lugar a una inmunoregulación negativa de la Diabetes tipo I, colitis ulcerosa y encefalomiелitis experimental autoinmune en modelos animales (Ashour *et al.*, 2014; Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010; Hübner *et al.*, 2012), mientras que la infección por *S. mansoni* disminuyó la inflamación característica del asma en las vías aéreas (Pacífico *et al.*, 2009).

Por otro lado, también se han realizado ensayos en humanos. La ingestión de huevos de *T. suis* así como la infección por larvas de *N. americanus* se han empleado en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y rinitis alérgicas, mejorándolas (Croese *et al.*, 2006; Summers *et al.*, 2003). Sin embargo, la evaluación de estos tratamientos mediante meta-análisis más amplios concluyeron que aún son necesarios

más datos para asegurar la eficacia y seguridad los mismos (Croft *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2014; Maizels, 2016).

Por tanto, antes de considerar a los helmintos o sus productos como potenciales tratamientos clínicos, convendría profundizar aún más en los mecanismos y moléculas implicadas, pues esto permitiría reducir e incluso evitar posibles riesgos como es la reducción en la eficacia de las vacunas o del sistema inmunitario frente al desarrollo de tumores (Maizels y McSorley, 2016).

A este respecto, en los últimos años se han realizado grandes avances, llegando a definir bien determinados mecanismos moleculares y celulares. Esto incluye la capacidad para inducir la producción de citocinas reguladoras, IL-10 y TGF- β (suprimiendo las respuestas Th1 y Th17) (Shiny *et al.*, 2011); el reclutamiento de linfocitos CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Layland *et al.*, 2013); la activación alternativa de macrófagos originando un fenotipo anti-inflamatorio (Du *et al.*, 2014b), y la modificación selectiva de la respuesta Th2, manteniendo altos niveles de IL-4, pero disminuyendo los niveles de IgE y aumentando los de IgG4 (lo cual probablemente esté ligado al incremento en los niveles de IL-10 que inducen a los linfocitos B al cambio de isotipo) (Platts-Mills *et al.*, 2004; Kurniawan *et al.*, 1992; Jeannin *et al.*, 1998). Ahora bien, estos mecanismos varían en función de la especie parásita estudiada, el modelo experimental empleado, el protocolo de tratamiento y otros factores (Bashi *et al.*, 2015; Maizels y McSorley, 2016).

Finalmente, resaltar que la inmunoregulación llevada a cabo por los helmintos depende, en gran medida, de la carga infectiva y del tiempo de parasitación, además de la predisposición genética y factores propios del hospedador (Cooper *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2007). Esto nos lleva al siguiente apartado, en el cual se desarrolla brevemente la “Hipótesis de la Higiene”, que postula la posible relación entre el incremento de los desórdenes inmunitarios en aquellas poblaciones en las que los helmintos han sido casi retirados por completo de nuestro entorno.

4.1. Hipótesis de la higiene

Resulta evidente que, como consecuencia de esta adaptación, los helmintos pueden modular la respuesta inmunológica de sus hospedadores actuando a diferentes niveles del sistema inmunitario. Así, como ya hemos dicho en repetidas ocasiones, son capaces de inhibir la producción de mediadores inflamatorios y favorecer la liberación de citocinas inmunorreguladoras (IL-10, TGF- β). Esto, a su vez, ayuda a la generación de T reguladores, a la expansión de linfocitos Th2 y a la modulación negativa de los clones de linfocitos T de fenotipo pro-inflamatorio (Th1 y Th17). Todo esto, indirectamente, puede tener como consecuencia la mejoría de las afecciones autoinmunes, así como, la prevención del desarrollo de alergias.

En consecuencia, la mejor comprensión de los mecanismos inflamatorios ha dado lugar a un nuevo paradigma en la inmunidad frente a los helmintos. Se ha demostrado que los helmintos actúan sobre los epitelios, causando la liberación de unas citocinas

denominadas “alarminas” (IL-25, IL-33), así como linfopoyetina estromal tímica, que inducen la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 por células de la inmunidad innata y estimulan respuestas de tipo Th2. También se generan linfocitos T y B reguladores que producen IL-10. Finalmente, esos mecanismos tendrán como principal consecuencia la depresión de las células Th1 y Th17 que están implicadas en la respuesta inflamatoria inicial (Figura 10).

Todos estos efectos se producen en el contexto de una predisposición genética, donde los helmintos pueden alterar la respuesta inmune, a través de la regulación evolutiva del “inmunoma”, así como la regulación epigenética en etapas clave del desarrollo, como en el periodo intrauterino y en la primera infancia (Khan y Fallon, 2013; Wammes *et al.*, 2013).

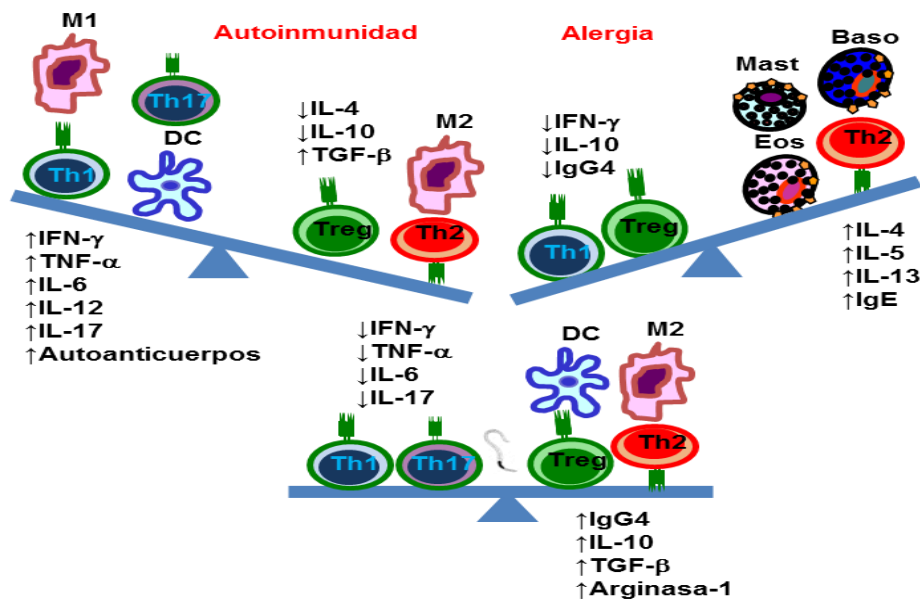


Figura 10. Muestra el paradigma de la Hipótesis de la Higiene. Las respuestas responsables del desequilibrio que puede llevar a la autoinmunidad serían principalmente Th1 y Th17, a través de CDs, macrófagos y citocinas proinflamatorias. Mientras que, en individuos alérgicos (atópicos), predominaría una respuesta de carácter Th2, con carencia de células tipo Th1 y una reducción en las células reguladoras (Treg). La secreción de IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13 estimularía la producción de IgE, eosinofilia y aumento en el número de mastocitos y basófilos. El empleo de los helmintos como estrategia terapéutica podría devolver el equilibrio homeostático entre las respuestas Th1/Th17 (autoinmunidad) y Th2 (alergia) a través de la inducción de un ambiente inmunorregulador, en presencia de citocinas que favorecen la reparación celular, como TGF-β y la IL-10. Modificado de Khan y Fallon (2013).

La “Hipótesis de la Higiene” propone que la co-evolución de los helmintos y el ser humano como hospedador ha originado la selección de un sistema inmunológico adaptado a los helmintos que incluye la producción de IgE (Fumagalli *et al.*, 2009). No solo eso, si no que las medidas sanitarias para reducir las infecciones helmínticas han alterado nuestra inmuno-ecología y, consecuentemente, los niveles de IgE de los humanos modernos han caído. De este modo, la ausencia de estimulación para la

producción de IgE por los helmintos habría aumentado la vulnerabilidad frente a enfermedades infecciosas, alergias y enfermedades autoinmunes (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002; Rook, 2009; Allen y Maizels, 2011).

Por tanto, si esta hipótesis fuera realmente cierta, plantearía cuestiones como: ¿La tasa de IgE es proporcional a la carga parasitaria? ¿Fueron los helmintos responsables de esa presión selectiva para el funcionamiento del sistema inmunológico? ¿Los niveles elevados de IgE producidos por selección natural supusieron una ventaja dietética? (London y Hruschka, 2014).

Además, Caraballo y Acevedo (2011), al estudiar el impacto de las infecciones por *A. lumbricoides* sobre la alergia en regiones tropicales, plantearon nuevas dudas acerca de las posibles relaciones entre los helmintos y el sistema inmunológico: ¿Las infecciones crónicas con cargas parasitarias altas producen inmunosupresión? ¿Las infecciones intermitentes con cargas parasitarias bajas estimulan la producción de IgE? ¿La ausencia de infección significa ausencia de inmuno-regulación?

Finalmente, aplicando las leyes de la biología evolutiva a *Anisakis* sp., la elevada prevalencia de enfermedades alérgicas clínicamente subsecuentes al parasitismo por este nematodo se podría atribuir al hecho de que el ser humano no es un hospedador natural de este parásito. Se trata de un parasitismo agudo o “intermitente” y, por lo tanto, carecería de las características inmunorreguladoras típicas de las helmintosis crónicas. Incluso se ha propuesto que la urticaria podría ser el resultado clínico exagerado de un mecanismo inmunológico beneficioso conservado evolutivamente y que permite la eliminación de las larvas a las pocas horas de la ingestión del pescado parasitado (Daschner y Cuéllar, 2010).

La falta de adaptación al hospedador humano tiene como consecuencia reacciones violentas por parte de éste que, en algunos casos, desencadenan reacciones alérgicas de tipo agudo. Por el contrario, en otros casos la presencia de algunos helmintos parásitos se ha relacionado con una menor prevalencia de asma como es el caso de *N. americanus* y *S. mansoni*.

Hay cuatro factores que pueden determinar los efectos de los helmintos sobre la alergia (Cooper *et al.*, 2009):

- **El tiempo y duración de la infección.** Las infecciones tardías y cortas pueden incrementar las alergias.
- **La intensidad de la infección.** Las infecciones leves tienen efectos negativos sobre la alergia.
- **La genética del hospedador.** Los individuos genéticamente susceptibles a las enfermedades atópicas serán más proclives a desarrollar respuestas alérgicas frente a helmintos y otros alérgenos no parasitarios siendo más resistentes a las infecciones.

- **El propio parásito.** Actualmente, *Anisakis* es el único helminto parásito que se acepta que está verdaderamente implicado en la aparición de enfermedades alérgicas asociadas a la parasitación (EFSA, 2010).

4.2. Toll-like receptors (TLR)

Las células del sistema inmune reconocen patógenos mediante patrones especiales a través de receptores de la superficie celular. Estos receptores son denominados *Toll-like receptors* (TLR) dado su parecido con el receptor *Toll* descubierto en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).

Los TLR son proteínas transmembranales de tipo I muy bien conservadas filogenéticamente. La señalización producida por los TLR produce una activación del factor nuclear NF- κ B e induce efectos adyuvantes inmunológicos, los cuales están principalmente mediados por citocinas proinflamatorias. No solo actúan reconociendo los patrones moleculares de los patógenos, si no que inician y modulan la respuesta inmunitaria adaptativa. La activación de estos receptores dará lugar a la maduración de las CPA que los portan, como son las CD y macrófagos, encargados de iniciar la respuesta inmune adaptativa mediante la activación de los linfocitos T y B (Schnare *et al.* 2001).

Se han identificado 10 (TLR 1-10) y 12 (TLR 1-9, y TLR 11-13) miembros de la familia de los TLR en humanos y ratones, respectivamente, y sus ligandos han sido bien caracterizados (De Nardo, 2015; Ospelt y Gay, 2010). En la Tabla 5 se muestra un resumen. Como puede verse en la tabla, pueden expresarse en la membrana celular o bien ser intracelulares. Todos van a presentar motivos intracelulares tipo *Toll/Interleukin-1 Receptor* (TIR) capaces de reclutar a Myd88 tras activarse, lo cual iniciará una cascada intracelular que termina con la translocación de NF- κ B al núcleo y la expresión de citocinas proinflamatorias e IFN tipo I con el objetivo de eliminar al patógeno (Ospelt y Gay, 2010; Anwar *et al.* 2013).

Tabla 5. TLR: ligandos y producción de citocinas.

| TLR | Localización | Ligando | Adaptador de la señal | Función |
|--------|---|---|-------------------------|--|
| TLR2-1 | Membrana plasmática | Lipoproteínas de micobacterias, lipopéptidos triacilados (PAM3CSK4) | MAL / Myd88 | Citocinas proinflamatorias |
| TLR2-6 | Membrana plasmática | Peptidoglicano, Lipoproteínas de Micoplasma, ácido lipoteicoico | MAL / Myd88 | Citocinas proinflamatorias |
| TLR3 | Membrana endosómica | Poly (I:C) (ARN viral de doble hebra) | TRIF | Citocinas proinflamatorias, IFN tipo I |
| TLR4 | Membrana plasmática/ Membrana endosómica | LPS, virus respiratorios sinticiales | MAL/ Myd88 TRAM/TRIF | Citocinas proinflamatorias, IFN tipo I |
| TLR5 | Membrana plasmática | Flagelina | Myd88 | Citocinas proinflamatorias |
| TLR7 | Membrana endosómica | ARN viral monohebra, análogos de la guanosina | Myd88 | Citocinas proinflamatorias, IFN tipo I |
| TLR8 | Membrana endosómica | ARN viral monohebra | Myd88 | Citocinas proinflamatorias, IFN tipo I |
| TLR9 | Membrana endosómica | Motivos CpG no metilados de bacterias y virus, hemozoina de <i>Plasmodium</i> | Myd88 | Citocinas proinflamatorias, IFN tipo I |
| TLR10 | Membrana plasmática | Moléculas tipo profilina | Myd88 | Citocinas proinflamatorias |
| TLR11 | Membrana endosómica | Moléculas tipo profilina, bacterias uropatógenas | Myd88 | Citocinas proinflamatorias |
| TLR12 | Membrana endosómica | Moléculas tipo profilina | Myd88 | Citocinas proinflamatorias |
| TLR13 | Membrana endosómica | ARNr 23S bacteriano | Myd88 | Citocinas proinflamatorias |

Todos los TLR emplean una vía dependiente de Myd88, a excepción de TLR3, que emplea una vía dependiente de *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) (Figura 11). Así, la actuación de los patógenos sobre los TLR produce la estimulación rápida de la síntesis y liberación de citocinas por los monocitos, macrófagos y CDs (Takeda *et al.*, 2003).

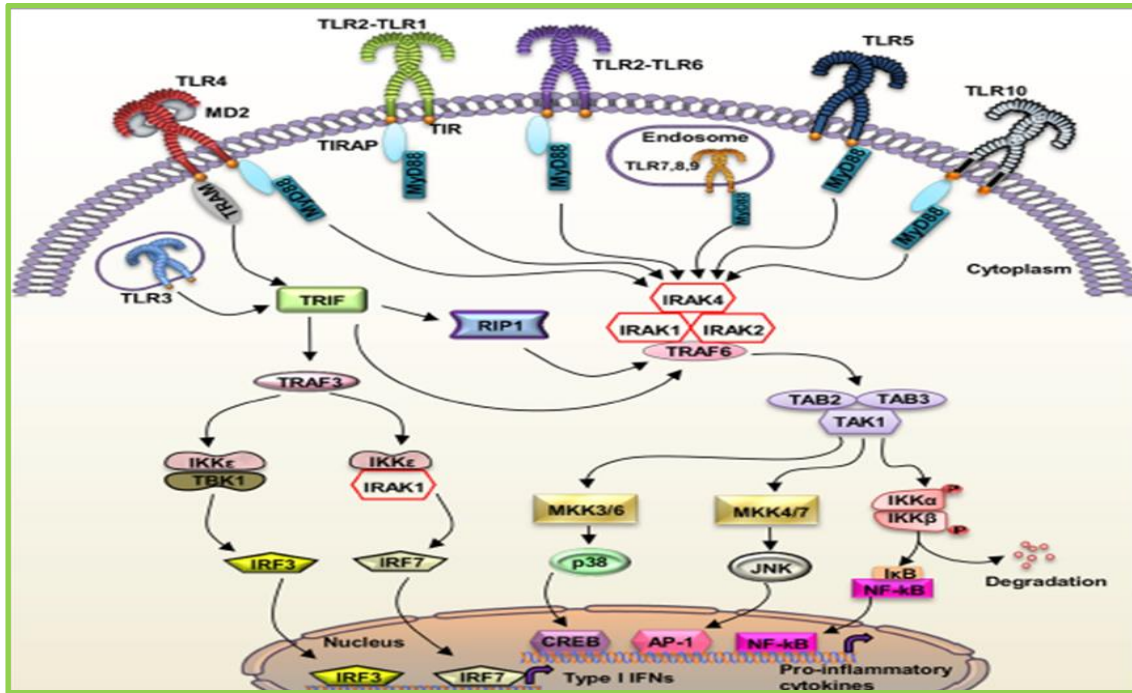


Figura 11. Resumen de las vías de señalización activadas por los TLR. Los ligandos procedentes de patógenos son reconocidos por su TLR específico correspondiente (situado en la membrana plasmática, o intracelularmente en la membrana endosomal) y comienza la señal intracelular. Con la excepción de TLR3, todos los TLR activarán la vía dependiente de Myd88. Este, a su vez, reclutará proteínas de la familia IRAK con la ayuda de la proteína TRAF6. Las proteínas IRAK son fosforiladas y pasan la señal al complejo TAK1, que activa el complejo IKK. Este último fosforila $\text{I}\kappa\text{B}$, provocando su degradación y la liberación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y, por tanto, su translocación al núcleo, dando lugar a la expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias. Por su parte, TLR3 y TLR4 activan una vía de señalización independiente de Myd88 en la que TRIF recluta la proteína adaptadora TRAM en el caso de TLR4. Después, se activa el factor TRAF3 que pasa la señal a TBK1 e $\text{IKK}\epsilon$, que activan a IRF3 e IRF7, respectivamente. Las proteínas IRF entran en el núcleo celular y promueven la transcripción de IFN de tipo I (Asma *et al.*, 2016).

Los helmintos, al igual que el resto de patógenos, pueden tener efectos directos sobre las respuestas inmunológicas innatas a través de la interacción con estos receptores. Por ejemplo, algunos antígenos de esquistosomas son capaces de regular la capacidad de las CD para responder a la activación de los TLR (Kane *et al.*, 2004; van der Kleij D. *et al.*, 2002). Se sabe que las moléculas glicosiladas, expresadas y secretadas por *S. mansoni* se unen a los receptores tipo C-selectinas y antagonizan una vía proinflamatoria mediada por TLR (Thomas *et al.*, 2005).

Se ha demostrado, asimismo, que la activación inmunológica crónica asociada a las infecciones intestinales helmínticas dan lugar a señales de transducción incorrectas y anergia (Borkow y Bentwich, 2004), habiéndose propuesto, incluso, algunos factores de transcripción como señales terapéuticas (Doganci *et al.*, 2005). En las CD tolerogénicas se ha descrito la sobre-expresión de algunos factores de transcripción (Li *et al.*, 2006; Tsukada *et al.*, 2005), por lo que resulta interesante detectar los posibles cambios en la señalización asociados a respuestas tolerogénicas Th1 o Th2.

Por este motivo es necesario profundizar sobre cómo los antígenos larvarios de *A. simplex* actúan sobre los TLR de ratón previamente descritos.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral pueden dividirse en dos partes diferenciadas: estudios realizados *in vitro* en modelos murinos y, por otro lado, estudios realizados en humanos.

1. Objetivos generales

1.1. Parte I: Estudios en modelos murinos

La hipótesis experimental del presente trabajo es que los productos larvarios de *A. simplex* pueden ser mediadores de inmunosupresión, siendo atrapados por las CDs de la mucosa, que producirán señales tolerogénicas capaces de inducir la expansión de subpoblaciones de linfocitos T con función reguladora.

- Se propone el estudio del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre la función de las CDs y los linfocitos T.
- Se investigará también cómo los antígenos del parásito afectan a la fisiología de las CDs para iniciar una respuesta tolerogénica.

Como antígeno se utilizarán los productos larvarios totales y de excreción-secreción de las larvas de tercer estadio de *A. simplex*. Se utilizarán modelos murinos ya que las subclases de CDs tolerogénicas y los T_{reg} son similares a los humanos en fenotipo y función.

1.2. Parte II: Estudios en humanos

En este caso, la hipótesis experimental se basó en la posibilidad de que, como en el apartado anterior, los productos larvarios de *Anisakis* sp. actúen como mediadores de inmunosupresión. Así, sus productos podrían interaccionar de forma directa con las CDs de la mucosa intestinal y estas, a su vez, producir señales tolerogénicas capaces de inducir cambios en las poblaciones de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

Por otro lado, existen evidencias del papel de la inmunosupresión en la sepsis, aumentando la susceptibilidad del hospedador ante infecciones secundarias oportunistas o reactivando infecciones latentes. Los pacientes sépticos presentan descenso de las poblaciones de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, especialmente de estas últimas, que a su vez se han relacionado con la severidad del proceso. El potencial papel inmunosupresor de los antígenos larvarios de *A. simplex* podría suponer un descenso de las poblaciones de LT $\gamma\delta$ tras un contacto previo con el parásito.

Así, se planteó el estudio de los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en individuos sanos y pacientes sépticos, y su relación con las distintas poblaciones de linfocitos T y B.

2. Objetivos concretos

Los objetivos concretos de la tesis doctoral son:

2.1. Parte I

A) Determinación del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre el fenotipo y función de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDDCs):

- Cambios en fenotipo y activación.
- Cambios en la producción de citocinas.
- Cambios en la señalización celular.

B) Estudio de la capacidad de las CDs estimuladas con los productos larvarios de *A. simplex* sobre el fenotipo, la función y la capacidad para generar T_{reg}.

C) Investigación del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre la capacidad proliferativa de linfocitos extraídos de bazo de ratón *in vitro*.

2.2. Parte II

A) Analizar los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en el suero de individuos sanos, y su relación con los diferentes subtipos de linfocitos T y B.

B) Analizar los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en el suero de pacientes sépticos, y su relación con los diferentes subtipos de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y la severidad de la enfermedad.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material de laboratorio

A) Material estéril

- Puntas blancas, amarillas y azules.
- Tubos de plástico de centrifuga de 10 ml y 50 ml.
- Placas Petri de plástico.
- Pinzas y tijeras de metal.
- Jeringas de plástico de 1 ml y 10 ml.
- Bisturí de metal (ROMED).
- Frascos de vidrio para almacenar medios de cultivo.
- Filtros de nailon (Cell Strainer 70 μm Nylon, BD Falcom).
- Filtros de esterilización 0,25 μm (Seringue filter Ac 30 MM 0,2 μm , Single).
- Pipetas de 10 ml.
- Eppendorfs de plástico.
- Placas de 6 pocillos de plástico de fondo plano (COSTAR).
- Placas de 96 pocillos de plástico de fondo en U (DELTALAB).
- Placas de 96 pocillos de plástico de fondo plano (DELTALAB).
- Frasco para cultivo celular de plástico 225 cm^2 (FLASK, CORNING).
- Rascador de plástico 25 cm (Cell Scraper, SARSTEDT).
- Rejilla metálica.

B) Material no estéril

- Cámara de Neubauer.
- Eppendorfs de plástico.
- Erlenmeyer de vidrio.

- Puntas blancas, amarillas y azules.
- Frascos de vidrio para almacenar reactivos/disoluciones.
- Pipetas de 10 ml.
- Placas Petri de plástico.
- Placas de 96 pocillos de plástico de fondo en U (DELTALAB).
- Placas de 96 pocillos de plástico de fondo plano (DELTALAB).
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Probeta de vidrio.
- Tubos de plástico de centrifuga de 10 ml y 50 ml.
- Tubos de plástico para citometría de flujo.
- Vasos de precipitados de plástico.

C) Maquinaria empleada

- Analizados automatizado hematológico Coulter LH750 (Beckman-Coulter).
- Analizador Cobas e601 (Roche Diagnostics).
- Analizador de gases ABL800 FLEX (Radiometer).
- Autoclave (P-Selecta).
- Balanza de precisión (Mettler AE 100).
- Baño (Unitronic 6320100, P-Selecta).
- Campana de flujo laminar (Telstar S.A., Tarrasa, España).
- Centrífuga C5403 Eppendorf.
- Centrífuga MICRO 12-24 Eppendorf, Hettich.
- Centrífuga ECCO-PRAXA-2.
- Citómetro de Flujo Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter) .
- Citómetro de flujo FACScalibur (BD) y FACScan (BD) (ICTS, Centro Nacional de Microscopía Electrónica, UCM).

- Analizador automatizado hematológico Coulter LH750 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).
- Estufa CO₂ al 5% y 37 °C (Hucoa-Erlöss, S.A.).
- Estufa a 28°C y ausencia de CO₂.
- Espectrofluorímetro (Infinite F200, TECAN).
- Espectrofotómetro (ELX808, Biotek).
- Equipo para Western Blot (Bio-Rad).
- Microscopio (OLYMPUS PP50).
- Sonicador (Virsonic 5 Virtis).

1.2. Material biológico

A) *Anisakis simplex*

Las larvas en tercer estadio (L3) de *A. simplex* se extrajeron manualmente a partir de músculo y vísceras de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*), destinadas al consumo humano.

Una vez extraídas e identificadas, se emplearon, principalmente, para la obtención y purificación de sus extractos antigénicos, ES (antígeno excretor-secretor) y CE (extracto crudo), mediante los métodos correspondientes que se detallarán más adelante. ES y CE se emplearon en la mayor parte de los experimentos desarrollados, con el objetivo de estudiar sus propiedades inmunomoduladoras sobre el sistema inmunitario del hospedador.

B) Animales de experimentación

Todos los estudios *in vitro* se realizaron con ratones de las cepas consanguíneas BALB/c y C57BL/6J, proporcionadas por Harlan. Los ratones se mantienen en el animalario del Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.), en condiciones controladas de temperatura, humedad, fotoperiodo, alimentación, ventilación y limpieza de jaula y cama por técnicos especialistas y siguiendo las normas dispuestas en el RD 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. El estudio fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (CEA). Los animales empleados en la experimentación fueron hembras adultas de entre 6 y 14 semanas de edad al inicio de los ensayos.

C) Muestras humanas

Se realizaron dos estudios en humanos independientes en los que los sujetos de estudio fueron seleccionados y manejados clínicamente por el Dr. Juan Carlos Andreu Ballester del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

En primer lugar, se estudió la relación de los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en suero y de $LT\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ en sangre de sujetos sanos (Zamora *et al.* 2017). En el estudio participaron un total de 132 voluntarios sanos, 69 hombres (52,3 %), con una edad media de $63,1 \pm 20,6$ años, y 63 mujeres (47,7 %), con una edad media de $59,1 \pm 18$ años.

Se seleccionaron aleatoriamente de entre los familiares de pacientes que acudieron en algún momento al Hospital Arnau de Vilanova de Valencia. Los miembros que participaron en el estudio fueron preseleccionados en base a los siguientes criterios: ausencia de infecciones agudas, así como cualquier tipo de patología inflamatoria, autoinmunitaria o inmunodeficiencia, además de no haber recibido tratamiento alguno inmunosupresor o antibiótico, ni ningún tipo de vacuna en los últimos seis meses. Todos los sujetos que participaron se reclutaron a lo largo del año 2013.

En segundo lugar, se estudiaron los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en suero así como los niveles de linfocitos en sangre de pacientes con sepsis. Se trató de un estudio retrospectivo, constituido por el suero de 114 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión marcados en un estudio previo (Andreu-Ballester *et al.*, 2013): se incluyeron pacientes diagnosticados con un cuadro de sepsis, adultos mayores de 18 años atendidos en las Unidades de Emergencias o Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Arnau de Vilanova y del Hospital Doctor Peset Aleixandre en Valencia (España). Los controles se seleccionaron a partir de una población sana sin vínculos de sangre con el grupo de casos (pacientes sépticos). Los criterios de exclusión fueron presencia de enfermedad autoinmune o tratamiento inmunosupresor, así como el uso de vacuna en los seis meses previos al estudio. Así mismo, los miembros pertenecientes al grupo control no debían presentar enfermedad inflamatoria, inmunodeficiencia o autoinmunidad alguna, así como no haber sido vacunados en los seis meses previos al estudio. Tanto el grupo control como el de casos fueron paralelos en lo que se refiere al sexo y la edad (18-50 años, 51-70 años, > 71 años).

En ambos estudios, todos los participantes fueron previamente informados de los objetivos y procedimiento a seguir, autorizando su participación en el estudio mediante la firma del consentimiento informado. En aquellos pacientes en los que su estado de consciencia se encontraba seriamente limitado, el consentimiento se obtuvo de los correspondientes familiares. Así mismo, el Comité de Ética e Investigación de ambos hospitales aprobó los estudios.

1.3. Medios de cultivo

A) RPMI sin suero

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| RPMI 1640 Medium (SIGMA Aldrich) | 10,4 g |
| Bicarbonato de sodio | 2,2 g |
| Hepes | 5 g |
| Gentamicina | 0,06 g |
| Rojo Fenol | Punta de espátula |
| Agua destilada estéril | c.s.p. 1 l |
| Ajustar pH = 7,2 | |

Filtrar a vacío y conservar en botes estériles a 4°C, durante no más de 3 meses.

B) RPMI con suero

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| RPMI 1640 Medium (SIGMA Aldrich) | 10,4 g |
| Bicarbonato de sodio | 2,2 g |
| Hepes | 5 g |
| Gentamicina | 0,06 g |
| Rojo Fenol | Punta de espátula |
| Suero bovino fetal | 100 ml |
| Agua destilada estéril | c.s.p. 1 l |
| Ajustar PH= 7 | |

Filtrar a vacío y conservar en botes estériles a 4°C, durante no más de 3 meses.

C) Medio Mínimo Esencial de Eagle con Sales de Earle (SIGMA)

Este fue el medio empleado para el cultivo de las larvas L3 de *A. simplex* en estufa a 28°C y en ausencia de CO₂. Suplementar con:

| | |
|-------------|-------|
| Bicarbonato | 2,2 g |
|-------------|-------|

| | |
|-----------------------|------------|
| Glutamina | 0,292 g |
| Gentamicina | 0,4 % |
| Medio Mínimo Esencial | c.s.p. 1 l |

1.4. Soluciones, tampones, colorantes y reactivos generales

A) PBS10X

| | |
|---------------------------------|---------|
| NaCl | 8 g |
| HK ₂ PO ₄ | 1,21 g |
| H ₂ KPO ₄ | 0,34 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

B) PBS1X

| | |
|----------------------------------|----------------|
| PBS10X | 10 ml |
| Agua destilada | c.s.p. 1000 ml |
| Ajustar pH a 7. Conservar a 4°C. | |

C) BSA 5 % (Albúmina Sérica Brovina, Sigma)

| | |
|----------|--------|
| Albúmina | 5 g |
| PBS1X | 100 ml |

D) PBS1X/Tween 20 (PTB)

| | |
|----------------------|------------|
| Tween 20 | 2,5 ml |
| PBS 10X | 500 ml |
| Agua destilada | c.s.p. 5 l |
| Conservar en nevera. | |

E) PBE (PBS 1X/BSA 0,5%/EDTA 2mM)

| | |
|--------|---------|
| BSA | 5g |
| EDTA | 74,4 mg |
| PBS 1X | 100 ml |

Conservar en nevera.

F) Resazurina (SIGMA)

| | |
|------------|------|
| Resazurina | 5 mg |
| PBS 1X | 1 ml |

Se debe preparar en el momento inmediato a su uso y mantenerse protegida de la luz.
Se esteriliza mediante filtración.

G) Tinción Giemsa (1:10)

| | |
|----------------------------|--------------|
| Giemsa (Merck) | 1 ml |
| H ₂ O destilada | c.s.p. 10 ml |

Realizar en el momento de uso.

H) Azul Tripán

| | |
|------------------|------|
| Azul Tripán 0,4% | 1 ml |
| PBS1X | 9 ml |

Conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz.

I) Suero bovino fetal (Gibco®)

Se debe inactivar en baño de agua a 56°C durante 30 minutos, previamente a su uso. Se conserva fraccionado en tubos estériles de 50 ml a -20°C hasta su empleo.

J) Brefeldina A, *Penicilium brefeldianum* (Life Technologies)

Brefeldina A 5 mg

H₂O destilada/etanol puro (5:5) c.s.p. 10 ml

Concentración final en stock 0,5 mg/ml. Conservar a -80°C.

La concentración de trabajo empleada en todos los experimentos fue 10 ng/ml

K) Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, PEPTROTECH)

GM-CSF liofilizado 20 µg

H₂O destilada estéril 200 µl

Concentración final en stock 0,1 µg/µl. Conservar a -20°C. La concentración de trabajo empleada en todos los experimentos fue 0,02 µg/ml

1.5. Tampones y reactivos para citometría de flujo

A) Tampón de superficie

Azida sódica 0,1 g

PBS 1X/BSA 5% 100 ml

Conservar a 4°C, protegido de la luz.

En el momento de uso, se adiciona suero normal murino (NMS, SIGMA) al 10%:

Tampón de superficie 45 µl

NMS 50 µl

PBS 1X c.s.p. 500 µl

B) Tampón de permeabilización

Saponina 0,15 g

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| BSA (albúmina) | 0,15 g |
| Hepes | 0,36 g |
| CaCl | 0,022 g (en 1,5 ml PBS 1X, 100 mM). |
| Mg SO ₄ | 0,037 g (en 1,5 ml PBS 1X, 100 mM). |
| PBS 1X | c.s.p. 150 ml. |

Ajustar a pH = 7,4 y realizar alícuotas de 9 ml. Congelar a -20°C.

C) Paraformaldehído al 4% en PBS 1X

| | |
|--------------------------------|--------|
| Paraformaldehído | 4 g |
| PBS 1X (previamente calentado) | 100 ml |

Mezclar ambos componentes en campana de extracción y aplicando calor en agitación lenta 1-2 horas, para su completa disolución. A continuación, atemperar y ajustar pH a 7,2. Filtrar con papel de filtro y conservar a 4°C protegido de la luz.

1.6. Tampones, soluciones y reactivos para ELISA

A) PBS 1X-BSA 5%

| | |
|--------|-------|
| BSA 5% | 1 ml |
| PBS 1X | 50 ml |

Conservar a 4°C.

B) Tampón carbonato/ bicarbonato (0,1 M)

| | |
|---------------------------------|----------------|
| Na ₂ CO ₃ | 3,2 g |
| NaHCO ₃ | 5,9 g |
| Agua destilada | c.s.p. 1000 ml |

Ajustar pH a 9,6.

Conservar a 4°C protegido de la luz.

C) Tampón citrato-fosfato

| | |
|-----------------------------------|---------------|
| Citrato | 100 ml |
| Fosfato | 100 ml |
| Agua destilada | c.s.p. 400 ml |
| Ajustar pH a 5 y conservar a 4°C. | |

D) Citrato 0,1 M

| | |
|-----------------|----------------|
| Ácido cítrico | 21 g |
| Agua destilada | c.s.p. 1000 ml |
| Conservar a 4°C | |

E) Fosfato 0,2 M

| | |
|------------------|----------------|
| Fosfato Disódico | 35,6 g |
| Agua destilada | c.s.p. 1000 ml |
| Conservar a 4°C. | |

F) Solución de antígeno total (CE) tapizadora (ELISA indirecto)

| | |
|------------------------------|-------|
| CE | 10 µg |
| Tampón bicarbonato/carbonato | 1 ml |

Se añaden 100 µl/pocillo de esta solución, incubando a 4°C toda la noche.

G) Reactivo de frenado para ELISA (H₂SO₄ 3N)

| | |
|--------------------------------|---------------|
| H ₂ SO ₄ | 80 ml |
| Agua destilada | c.s.p. 500 ml |

Conservar temperatura ambiente protegido de la luz.

1.7. Antígenos ensayados

A) Productos de *Anisakis simplex*

- **Extracto crudo de *Anisakis simplex* (CE)**

| | |
|---------------------|---------|
| Solución madre (CE) | x mg/ml |
|---------------------|---------|

| | |
|--------|-------------|
| PBS 1X | c.s.p. 1 ml |
|--------|-------------|

Preparar alícuotas a una concentración final de 500 µg/ml CE a partir de las soluciones madres, cuyas concentraciones fueron previamente determinadas por el método de Bradford. A continuación, esterilizar mediante filtración empleando filtros de 0,22 µm. Conservar a - 20°C. En todos los experimentos realizados se empleó una concentración de 50 µg/ml de CE.

- **Antígeno excretor-secretor *Anisakis simplex* (ES)**

| | |
|---------------------|---------|
| Solución madre (ES) | x mg/ml |
|---------------------|---------|

| | |
|--------|------------|
| PBS 1X | c.s.p. 1ml |
|--------|------------|

Preparar alícuotas a una concentración final de 0,12 µg/ ml ES a partir de las soluciones madres, cuyas concentraciones fueron previamente determinadas por el método de Bradford. A continuación, esterilizar mediante filtración empleando filtros de 0,22 µm. Conservar a - 20°C. En todos los experimentos realizados se empleó una concentración de 0,012 µg/ ml de ES.

B) Ligandos de TLR (*Toll Like Receptors*)

- **CpG Clase B (ODN1826) (*Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen*)**

| | |
|---------------|------|
| CpG (ODN1826) | 1 mg |
|---------------|------|

| | |
|------------------------------------|-----------|
| H ₂ O destilada estéril | 314,96 ml |
|------------------------------------|-----------|

Conservar a -20°C. En todos los experimentos realizados se empleó una concentración de 50 µg/ml de CpG (ODN1826).

- **FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF) – *Mycoplasma salivarium* (Mouse TLR1-9**

Agonist Kit, Invivogen

| | |
|-------|-------|
| FSL-1 | 10 µg |
|-------|-------|

| | |
|------------------------------------|--------|
| H ₂ O destilada estéril | 100 µl |
|------------------------------------|--------|

Conservar a –20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó con una concentración de 0,1µg/ml.

- **HKLM - *Listeria monocytogenes* (Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen)**

| | |
|------|-------------------------|
| HKLM | 10 ⁸ células |
|------|-------------------------|

| | |
|------------------------------------|--------|
| H ₂ O destilada estéril | 100 µl |
|------------------------------------|--------|

Conservar a –20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 10⁷ células/ml.

- **LPS - *E. coli* K12 (Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen)**

| | |
|------------------------|--------|
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 100 µg |
|------------------------|--------|

| | |
|------------------------------------|---------|
| H ₂ O destilada estéril | 1000 µl |
|------------------------------------|---------|

Conservar a –20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 1 µg/ml.

- **LPS - *E. coli* 026B6 (SIGMA Aldrich)**

| | |
|--------------------------|--------|
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 100 µg |
|--------------------------|--------|

| | |
|------------------------------------|---------|
| H ₂ O destilada estéril | 1000 µl |
|------------------------------------|---------|

Conservar a –20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 1 µg/ml.

- **Pam3CSK4 (Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen)**

| | |
|----------|-------|
| Pam3CSK4 | 10 µg |
|----------|-------|

| | |
|------------------------------------|--------|
| H ₂ O destilada estéril | 100 µl |
|------------------------------------|--------|

Conservar a –20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 0,1 µg/ml.

- **Poly (I:C) (Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen)**

| | |
|------------|--------|
| Poly (I:C) | 500 µg |
|------------|--------|

H₂O destilada estéril 500 µl

Conservar a -20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 1 µg/ml.

- **Poly (I:C) LMW (*Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen*)**

Poly (I:C) LMW 500 µg

H₂O destilada estéril 500 µl

Conservar a -20°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 1 µg/ml.

- **ssARN 40 (*Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen*)**

ssARN 40 25 µg

H₂O destilada estéril 250 µl

Conservar a 4°C. En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 0,25 µg/ml.

- **ST-FLA *Salmonella typhimorium* (*Mouse TLR1-9 Agonist Kit, Invivogen*)**

ST-FLA 10 µg

H₂O destilada estéril 100 µl

Conservar a -20°C En todos los experimentos realizados se trabajó a una concentración de 0,1 µg/ml.

1.8. Programas informáticos y estadísticos

Se emplearon los siguientes programas informáticos para el análisis de datos de esta Tesis Doctoral.

A) **Análisis de Datos en Citometría de Flujo**

Los datos obtenidos mediante Citometría de Flujo (CMF) se analizaron empleando:

- **WinMDI 2.9 (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*)**

Programa de libre acceso para el análisis de datos obtenidos por CMF. Está dotado de todas las funciones básicas para el análisis de los datos obtenidos por CMF.

Se ha empleado principalmente para la construcción de los *Dot-Plots* e Histogramas presentados en esta Tesis.

- ***Flowing software***

Flowing Software es otro programa de libre acceso para el análisis de datos obtenidos mediante CMF. Es el resultado de un proyecto de investigación llevado a cabo por Perttu Terho en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Turku (Finlandia).

Se empleó para el análisis de todos los datos obtenidos por CMF de esta Tesis Doctoral: determinación de los porcentajes de células positivas para cada marcador estudiado así como la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean).

B) Programas estadísticos

Los siguientes programas estadísticos se emplearon para realizar todos los análisis estadísticos presentados en el apartado de Resultados de esta Tesis Doctoral

- ***GraphPad 6.0***

Programa informático que combina la capacidad de organizar datos, realizar análisis estadísticos avanzados, regresión no lineal y su especialidad, todo tipo de gráficos científicos. Es de fácil uso, rápido y sencillo, ampliamente utilizado en la comunidad científica.

- **SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)**

SPSS es un programa estadístico empleado a nivel internacional, tanto en las ciencias científicas como sociales. Permite el análisis de grandes bases de datos y presenta una interfase de fácil manejo.

Este programa se combinó junto con el *GraphPad 6.0* para el análisis estadístico y la realización de gráficos. La principal diferencia entre ambos es que el SPSS es un programa estadístico en el cual se pueden realizar gráficos, mientras que *GraphPad* es un programa especializado en el desarrollo de gráficos en el que además se pueden realizar análisis estadísticos.

2. Métodos

Los Métodos y Técnicas empleados en esta Tesis Doctoral fueron:

- **Citometría de Flujo.** Empleada sobre BMDDCs y linfocitos de ratón, así como en células sanguíneas humanas.

- **Ensayos de linfoproliferación con resazurina.** Se realizaron sobre linfocitos extraídos de bazo de ratón.
- **ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para la detección de IL-10 en sobrenadantes de BMDDCs de ratón.**
- **ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Anisakis* (IgG, IgM, IgE, IgA) en muestras de suero humano.**

A continuación procedemos a describir detalladamente todos los métodos empleados.

2.1. Obtención de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex*

2.1.1. Obtención de las larvas L3 de *Anisakis simplex*

Las larvas en tercer estadio (L3) de *A. simplex* se obtuvieron a partir de músculo y vísceras de bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) que contenían el parásito, procesándose del siguiente modo:

- Extraer las larvas manualmente con la ayuda de una aguja enmangada y unas pinzas (revisar tanto el interior como el exterior del pez).
- Identificar las larvas siguiendo las claves de Huang y Bussieras (1988).
- Lavar tres veces con agua destilada para eliminar los restos.
- Conservar a 4°C o a – 20°C, hasta el momento de su utilización (Perteguer y Cuéllar, 1998).

2.1.2. Obtención del antígeno total larvario de *Anisakis simplex*

Para la preparación del extracto crudo (CE) larvario de *A. simplex*, se procedió de la siguiente manera:

- Lavar varias veces los helmintos con solución salina estéril.
- Fragmentar y homogenizar manualmente en mortero hasta obtener una “pasta”.
- Sonicar durante 6 minutos (10 s/pulso) con un sonicador *Virsonic 5* (*Virtis*) al 70 % de potencia.
- Extraer el homogenizado en PBS a 4°C durante una noche.

- Delipidar con n-hexano (7:3 v/v) y centrifugar a 8497 g durante 30 minutos a 4°C (Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech, GmbH, Osterode, Denmark).
- Dializar el sobrenadante frente a PBS durante una noche a 4°C para eliminar las sales.
- Valorar el contenido proteico mediante la técnica de Bradford (1976).
- Congelar el extracto como “antígeno crudo”(CE) a – 20°C en alícuotas hasta su empleo.

2.1.3. Obtención del antígeno excretor-secretor de *Anisakis simplex*

El antígeno excretor-secretor (ES) se obtuvo mediante una modificación del método de Savigny (1977) empleado para la obtención de antígeno ES de *Toxocara canis* (Cuéllar *et al.*, 1995).

- Incubar durante una hora en solución salina estéril al 0,85% con gentamicina (4g/l), en el interior de una cámara de flujo laminar.
- Cultivar, una media de 20 larvas en un tubo de 25 ml con 10 ml de Medio Mínimo Esencial de Eagle con Sales de Earle (SIGMA), en estufa a 28°C y ausencia de CO₂.
- Cambiar el medio semanalmente, aspirándolo asépticamente y reemplazándolo por un volumen igual de medio estéril.
- Centrifugar y dializar frente a PBS 1X durante 48 h y a 4°C.
- Valorar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).
- Congelar el extracto como “antígeno excretor-secretor” (ES) a -20°C en alícuotas hasta su empleo.

2.1.4. Valoración de proteínas por el método de Bradford

Para valorar la concentración de proteínas contenidas en la muestra problema, se empleó el método de Bradford (1976):

- Preparar una curva patrón con BSA en PBS 1X a partir de una concentración de la proteína estándar de 1 mg/ml mediante diluciones de la misma, de la siguiente manera (Tabla 6):

Tabla 6. Preparación de la curva patrón para el método de Bradford.

| Cubeta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Blanco | Muestra problema |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|
| Solución patrón (BSA en PBS) | 2 µl | 4 µl | 8 µl | 12 µl | 16 µl | 20 µl | 0 µl | 5 µl |
| PBS | 798 µl | 796 µl | 792 µl | 788 µl | 784 µl | 780 µl | 800 µl | 795 µl |
| Reactivo de Bradford | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl |

- Preparar un blanco y la muestra problema en PBS 1X, adicionando 200 µl de reactivo de Bradford (BIO-RAD) por cada 800 µl de muestra (patrones y problema), y 800 µl de PBS 1X en el control (blanco).
- Agitar bien y dejar actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Medir las absorbancias a 595 nm en el espectrofotómetro (ELX 800 BIO-TEK INSTRUMENT, INC), de la muestra problema y los patrones frente al blanco.
- Representar gráficamente la absorbancia frente a la concentración de proteínas de las muestras patrón y extrapolar mediante una recta de regresión lineal la concentración de proteínas correspondiente a la muestra problema.

2.2. Métodos empleados sobre células de ratones BABL/c y C57BL/6

2.2.1. Obtención y cultivo de células murinas

A) Obtención y cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDDCs)

El procedimiento seguido para la obtención de linfocitos de bazo de ratón se realizó en las cepas de ratón estudiadas: BALB/c y C57BL/6. Se obtuvieron BMDDCs mediante la técnica siguiente (Figura 12):

- **Día 1.** Las hembras de ratón se sacrificaron mediante la inyección intraperitoneal de EuTalender (pentobarbital sódico 20%) (Normolab, Madrid) (0,05 ml/ratón). Dosis única. En la mayor brevedad posible y bajo condiciones de esterilidad, se procedió a la extracción de la médula ósea a partir del fémur y tibia de ambas extremidades inferiores.
- Sumergir el cadáver durante unos minutos en alcohol a 96° para asegurar su asepsia.
- En campana de flujo laminar, retirar el pellejo desde la cavidad abdominal hasta ambos extremos inferiores del cuerpo sobre una placa Petri estéril.

- Después, con ayuda de un bisturí estéril, separar ambas extremidades inferiores por la articulación que une la cabeza del fémur a la cadera, así como la separación de la tibia y el peroné del astrágalo.
- Eliminar el tejido muscular sobre una placa Petri estéril.
- Una vez limpios, dejar en medio RPMI 1640 (SIGMA) sin suero atemperado previamente a 37°C.
- Separan el fémur de la tibia y el peroné con el bisturí y unas pinzas. Seguidamente, seccionar las dos epífisis de cada hueso, quedando al descubierto la médula ósea.
- Sobre un filtro de 70 µm (Cell Strainer 70 µm Nylon, BD), y con ayuda de una jeringuilla estéril de 1 ml, forzar el paso de medio RPMI 1640 sin suero a través de la médula ósea. Realizar la punción de forma lenta y sostenida, y un mínimo de tres veces/hueso, para asegurar un rendimiento máximo en la extracción de células madre.
- Recoger la filtración sobre un tubo Falcon estéril de 50 ml y centrifugar (2500 r.p.m, 10 minutos).
- Retirar el sobrenadante y resuspender con 300 µl de tampón *Red Blood Cell Lysing Buffer* (SIGMA).
- Enrasar con RPMI 1640 sin suero hasta 20 ml y centrifugar (2500 r.p.m, 10 minutos).
- Retirar el sobrenadante y resuspender en RPMI 1640 con suero.
- Calcular la concentración de células obtenida por recuento celular con una cámara de Neubauer y Azul Tripán.
- Incubar la suspensión celular en *flasks* de 225 cm² (COSTAR) en 30 ml de medio RPMI 1640 (SIGMA) completo con 6 µl de GM-CSF a una concentración inicial de 5 X 10⁵ células/ml.

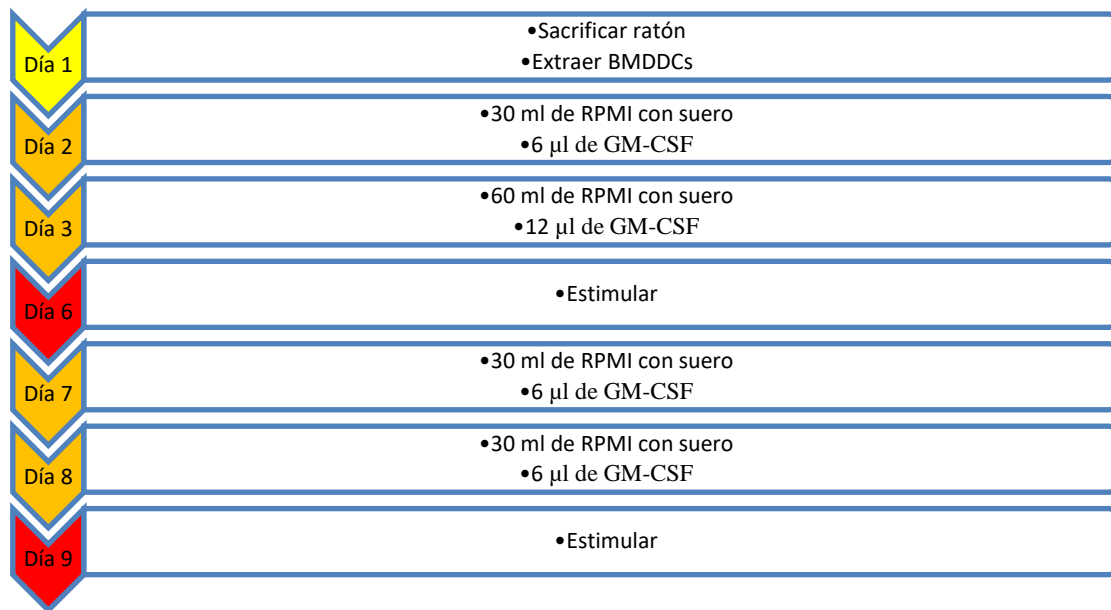


Figura 12. Resumen de los principales pasos a seguir en el protocolo de extracción y estimulación de BMDDCs.

• **Día 6 y 9.** Las BMDDCs ya maduras y diferenciadas se estimularon siguiendo el siguiente protocolo:

- Frotar con un rascador estéril el fondo del *flask* para despegar las células adheridas.
- Balancear con suavidad el recipiente para obtener una suspensión celular homogénea y realizar un nuevo recuento con cámara de Neubauer y Azul Tripán.
- Sembrar 2 ml/pocillo de suspensión celular en RPMI 1640 con suero en placas de 6 pocillos a una concentración de 1×10^6 células/ml (2×10^6 células/pocillo).
- Incubar en estufa unas dos horas, y posteriormente estimular con los correspondientes antígenos.

B) Obtención y cultivo de linfocitos vírgenes extraídos de bazo de ratón

El procedimiento seguido para la obtención de linfocitos de bazo de ratón fue el siguiente:

- Sacrificar como se ha indicado previamente y sumergir el cadáver en alcohol a 96° durante unos minutos.
- En campana de flujo laminar, retirar el pellejo de la cavidad abdominal.
- Con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras, realizar una incisión en el peritoneo, bajo las costillas izquierdas, y extraer el bazo.

- Colocar el bazo sobre una rejilla metálica, y con ayuda del émbolo de una jeringuilla de 10 ml machacar con suavidad, y alternar con breves lavados con RPMI sin suero.
- Centrifugar el contenido arrastrado (1200 r.p.m, 10 minutos, T^a ambiente).
- Desechar sobrenadante y resuspender el precipitado en 500 µl *lysis buffer*.
- Lavar con 20 ml de RPMI sin suero y centrifugar (1200 r.p.m, 10 minutos, T^a ambiente).
- Retirar sobrenadante y resuspender las células en RPMI con suero.
- Realizar un recuento celular con cámara de Neubauer y Azul Tripán.
- Preparar una suspensión celular en RPMI con suero a la concentración de 5x10⁶ células/ml, y dejar incubar 2-3 h en tubo estéril de 50 ml en estufa (CO₂ 5%, 37°C), a la espera de ser empleados.

2.2.2. Estimulación y caracterización de células murinas

A) Estudio de los efectos producidos por los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre distintos marcadores celulares en BMDDCs

A1) Estimulación de las BMDDCs

Tras 6 ó 9 nueve días de maduración, los antígenos empleados fueron los siguientes:

- Antígeno total larvario (CE) de *A. simplex* (50 µg/ml)
- Antígeno excretor-secretor larvario (ES) de *A. simplex* (0,012 µg/ml)
- LPS *E. coli* 026B6 (1 µg/ml)
- CpG (ODN1826) (50 µg/ml)
- LPS *E. coli* K12 (1 µg/ml)
- Pam3CSK4 (0,1 µg/ml)
- HKLM (10⁷ células /ml)
- FSL-1 (0,1 µg/ml)
- Poly (I:C) (1 µg /ml)
- Poly (I:C) LMW (1 µg /ml)
- ssARN 40 (0,25 µg /ml)

- ST-FLA (0,1 µg /ml)

Todos ellos se adicionaron a los pocillos en las concentraciones indicadas, solos o acompañados por ES o CE. Siempre se dejaron pocillos control, es decir, solo células y medio de cultivo (control negativo) tal y como se muestra en la Figura 13.

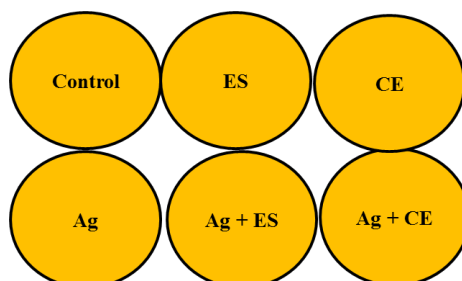


Figura 13. Representa el esquema seguido en la estimulación de BMDDCs. Ag representa cualquier estímulo empleado que no sea ES o CE.

Los tiempos de estimulación empleados variaron en función de los marcadores a determinar y las técnicas empleadas posteriormente. Siempre se incubaron en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Los experimentos se hicieron un mínimo de tres veces, bajo las mismas condiciones experimentales.

A.2.) Caracterización de las BMDDCs

A2.1.) Caracterización de las BMDDCs mediante Citometría de Flujo

Las BMDDCs se caracterizaron, tanto en ratones BALB/c como C57BL/6, mediante CMF evaluando la presencia o ausencia de los siguientes marcadores celulares a distintos tiempos de estimulación (Tabla 7):

Tabla 7. Diseño esquemático de los tiempos de estimulación para cada uno de los marcadores estudiados

| Moléculas de superficie | 12 h estimulación | 24 h estimulación |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| CD11c | X | X |
| CD80 | | X |
| CD86 | | X |
| MHC I | | X |
| MHC II | | X |
| Citocinas intracelulares | | |
| IL-10 | X | X |
| IL-12 | X | X |
| TNF-α | X | |
| Factores de transcripción | | |
| NF-κβ | X | |
| Myd88 | X | |

La muestra se marcó mediante inmunofluorescencia directa en combinaciones de dos o tres colores. Se fijaron y se tiñeron empleando los protocolos siguientes:

Anticuerpos monoclonales empleados

Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales:

- *PE Hamster Anti-Mouse CD11c* (BD PHarMingen)/*FITC Hamster Anti-Mouse CD11c* (BD PHarMingen). Este anticuerpo se une a la cadena αx de la integrina gp150 (**CD11c/CD18**), expresada principalmente en CDs, linfocitos intraepiteliales intestinales y algunos subtipos de células NK. También se ha detectado, a bajos niveles, en monocitos y macrófagos en bajos niveles.
- *FITC Hamster Anti-Mouse CD80* (BD PHarMingen). Reconoce la molécula **CD80 (B7-1)**. Esta se encuentra de forma constitutiva en la membrana de CDs, monocitos y macrófagos, así como su expresión es inducible en linfocitos B. CD80 participa, junto con CD86, en la coestimulación de las células T, a través de su interacción con CD28 y CD152 (CTLA-4).
- *FITC Rat Anti-Mouse CD86* (BD PHarMingen). Se une a la molécula coestimuladora **CD86 (B7-2)**, expresada por un amplio espectro de leucocitos (linfocitos B y T, macrófagos, CDs, astrocitos). CD86 es el ligando de CD28 y CD152 (CTLA-4), responsable de la coestimulación y activación de los linfocitos T y B. Además participa en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la citotoxicidad celular mediada por células NK. Sin embargo, su expresión basal es baja, aumentado sustancialmente bajo el efecto de distintos estímulos, como el LPS.
- *FITC Mouse Anti-Mouse H-2D[b]* (BD Biosciences). Se une a la molécula **MHC clase I H-2D [b]**. No se ha descrito reactividad con otros halotipos.
- *FITC Mouse Anti-Mouse H-2K[d]* (BD Biosciences). Reconoce el dominio $\alpha 3$ de la molécula **MHC de clase I H-2K[d]**. No se ha descrito reactividad con otros halotipos.
- *FITC Rat Anti-Mouse 1A/1E* (BD Biosciences); *Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) APC* (eBioscience). Se une al complejo principal de histocompatibilidad de clase II, en concreto, a las glicoproteínas I-A y I-E (I-A b, I-A d, I-A q, I-E d, I-E k). MHC II se encuentra en las células presentadoras de antígeno: linfocitos B activados, monocitos, macrófagos y CDs.
- *PE Rat Anti-Mouse IL-10* (BD Biosciences). Se une específicamente a la citocina **IL-10** de ratón. Esta citocina, también conocida como, Factor Inhibidor de la Síntesis de Citocinas (FISC), es producida por varios tipos celulares activados, como son: linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores, células NKT, linfocitos B, células NK, macrófagos, CDs, mastocitos, granulocitos y keratinocitos. La función de IL-10 es esencial en la regulación de las respuestas inmunitarias, así como proteger al individuo de posibles daños ocasionados por inflamaciones crónicas o fenómenos de autoinmunidad. Ejerce su función mediante la inhibición de la síntesis de citocinas por linfocitos T activados, células NK, monocitos y macrófagos. También participa en

la proliferación y desarrollo de los timocitos, diferenciación de células B y en la generación de células T citotóxicas.

- *Anti-Mouse IL-12/IL-23p40 PE* (eBioscience). Se une a la subunidad p40 de las citocinas **IL-12** e **IL-23**. La IL-12 es un heterodímero secretado por monocitos, macrófagos y CD⁺ activados. IL-23 es un heterodímero expresado solo por CD⁺ activadas.
- *Anti-Mouse TNF α APC* (eBioscience). Reconoce el Factor de Necrosis Tumoral alfa, citocina producida por monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T CD⁺. Es una molécula capaz de formar dímeros y trímeros solubles, así como permanecer unido a membranas. Presenta actividad citolítica celular así como participa en la regulación de las respuestas inmunitarias.
- *NF- κ B p65 (D14E12) XP Rabbit mAb* (Cell Signalling). Este anticuerpo es capaz de unirse a la familia **NF- κ B p65/Rel**, no se ha descrito reactividad cruzada con el resto de miembros de la familia NF- κ B/Rel. NF- κ B es un factor de transcripción que ocupa un papel primordial en las respuestas inflamatorias e inmunitarias. En células inactivadas, NF- κ B permanece secuestrado en el citoplasma por las proteínas I κ B. Pero la estimulación con agentes activadores, inducen la fosforilación de I κ B y su degradación por la vía del complejo proteasoma-ubiquitina, liberando así a NF- κ B, el cual se trasloca al núcleo celular y regula la expresión de los genes correspondientes relacionados con la síntesis de citocinas inflamatorias.
- *Purified anti-Myd88* (Biolegend). IgG policlonal de conejo que se une a Myd88 de ratón/humano. **Myd88** es una proteína adaptadora citoplasmática expresado en múltiples tipos celulares. Está involucrado en la señalización intracelular de los TLR y el receptor de la IL-1. Su activación resulta en la activación de NF- κ B.
- *Anti-Rabbit IgG (whole molecule) FITC* (SIGMA). Reconoce la molécula IgG de conejo. Por tanto se empleó como anticuerpo secundario a la hora de determinar los niveles de expresión de Myd88 y NF- κ B en CMF.

Combinación de los anticuerpos monoclonales

Se rotularon los tubos correspondientes con las siguientes combinaciones para la determinación de las distintas poblaciones celulares a estudiar (Figura 14):

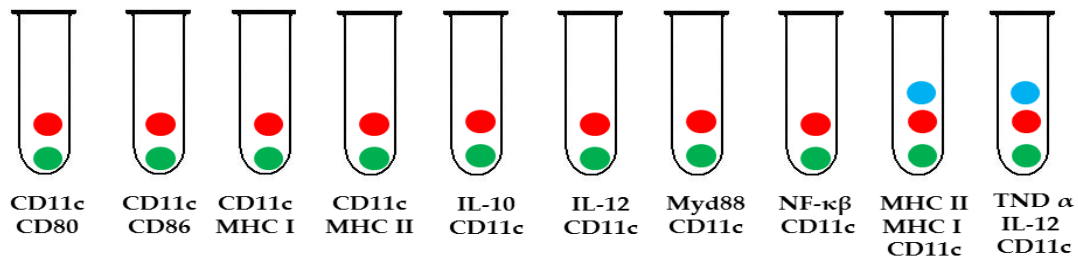


Figura 14. Representa las distintas asociaciones de los anticuerpos empleados. Los colores indican el tipo de fluorocromo empleado: Rojo (PE), Verde (FITC), Azul (APC).

Tinción de marcadores de superficie

- Despegar con un raspador las células adheridas a la superficie del fondo de cada pocillo, y traspasar el contenido a tubos de centrifuga.
- Centrifugar (1200 r.p.m., 10 minutos a 4°C).
- Eliminar el sobrenadante y fijar el precipitado en 1 ml de paraformaldeído (*Paraformaldehyde*, SIGMA) al 4%, 15 minutos a 4°C.
- Lavar con 9 ml de BSA al 0,1% en PBS, y centrifugar (1200 r.p.m., 10 minutos, 4°C).
- Retirar sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 μ l de tampón de superficie (BSA 5%, azida sódica 0,1% en PBS) con suero normal de ratón al 10% (*Mouse serum*, SIGMA) a 4°C.
- Adicionar 10 μ l del anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón (*Purified Rat Anti-Mouse CD16/32*, *Mouse BD Fc Block*, BD PHarmingen) por cada 500 μ l de tampón, para bloquear el receptor Fc. Incubar en hielo 30 minutos.
- Dispensar cada una de las alícuotas (100 μ l/pocillo) en placa de 96 pocillos con fondo en U.
- Centrifugar (1200 r.p.m., 5 minutos) y decantar el sobrenadante.
- Adicionar 100 μ l de tampón de superficie/pocillo y añadir 1 μ l de cada uno de los anticuerpos marcados con los fluorocromos por pocillo. Incubar 20 minutos en hielo y oscuridad.
- Realizar dos lavados: el primero con 100 μ l de tampón de superficie con suero normal de ratón 10%, y el segundo con 200 μ l de PBS. Ambos seguidos de las correspondientes centrifugaciones (1200 r.p.m., 5 minutos).

- Decantar el sobrenadante y resuspender las células fijadas y marcadas en 100 µl de PBS 1X. Transferir a los tubos de citometría.

Tinción intracelular de citocinas

Se efectuaron tinciones intracelulares (IL-12, IL-10 y TNF- α , marcando con CD11c) para analizar las citocinas mediante CMF. El protocolo seguido fue muy similar al llevado a cabo para los marcadores de superficie. Ahora bien, hubo diferencias a remarcar.

- En primer lugar, para poder determinar los niveles de citocinas intracelulares fue necesario emplear una molécula capaz de retener dichas citocinas en el interior de la célula: adicionar Brefeldina A (10 µg/ml), a las 12 y 24 h post-estimulación, a cada uno de los pocillos, y dejar actuar entre 5-6 horas. A continuación, se procedió a realizar exactamente el mismo protocolo técnico seguido para los marcadores de superficie.
- Fijar las células y realizar los correspondientes lavados.
- Resuspender en 500 µl de tampón de permeabilización con suero normal de ratón al 10%.
- Adicionar el anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón para bloquear el receptor Fc. Incubar 30 minutos a 4°C.
- Siempre suspendidas en tampón de permeabilización, realizar dos lavados, al igual que en el protocolo para marcadores de superficie.
- Añadir 100 µl/pocillo del tampón de permeabilización y 1 µl/pocillo de los correspondientes anticuerpos marcados con fluorocromos. Incubar 30 minutos en hielo y en oscuridad.
- Lavar con 100 µl de tampón de permeabilización con suero normal de ratón al 10%, y centrifugar (1200 rpm, 5 minutos).
- Nuevo lavado, esta vez con PBS 1X.
- Decantar el sobrenadante y resuspender las células fijadas y marcadas en 100 µl de PBS 1X transferir a los tubos de citometría.

Tinción intracelular de factores de transcripción

Se efectuaron tinciones intracelulares de Myd88 y NF- κ B. La metodología empleada fue la misma que para el protocolo de tinción intracelular ya descrito para las citocinas. Solo hubo dos diferencias:

- Los anticuerpos empleados para la detección, tanto de Myd88 como NF- κ B, no estaban marcados con fluorocromos. Por tanto, se empleó un anticuerpo secundario en una segunda incubación en las mismas condiciones ya descritas para tinción intracelular.
- No fue necesaria la adición de Brefeldina A.

Adquisición de los datos

La calibración, compensación y adquisición de los datos se realizó en el Centro de Citometría y Microscopía de la U.C.M. Para la adquisición se utilizó el programa *Cell Quest*, y se analizaron un mínimo de 20.000 eventos. Los citómetros de flujo empleados fueron: FACSCan (BD) y FACSCalibur (BD).

Análisis de datos

Los datos generados por la CMF se analizaron con los programas *WinMDI 2.9.* y *Flowing software*, y se realizaron un mínimo de tres veces cada uno. Los formatos empleados con más frecuencia han sido el Histograma y el *Dot-Plot*, por su sencillez y porque permiten una rápida y clara visualización de los datos. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS.

En primer lugar, se seleccionaron las BMDDCs en función de las características de dispersión de la luz frontal (FSC) y lateral (SSC). Después, del total de células seleccionadas, se escogieron aquellas que fueron CD11c+ (Figura 15).

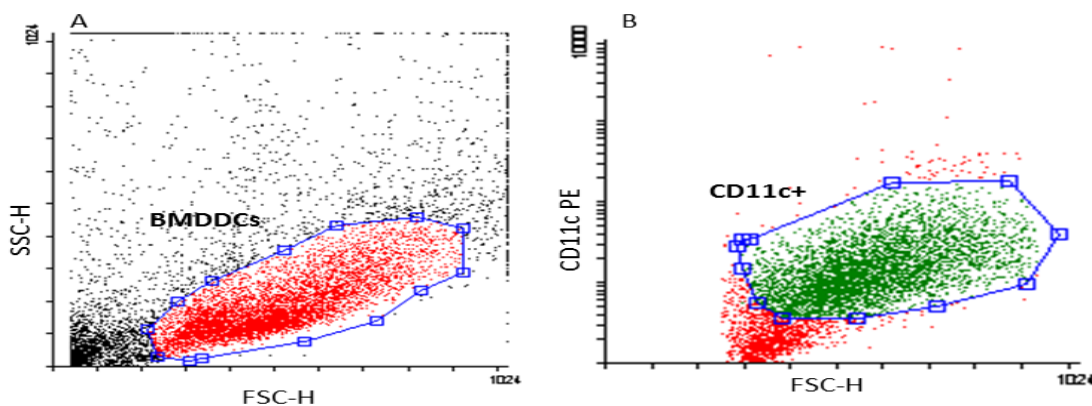


Figura 15. A. Selección de BMDDCs totales mediante los parámetros de dispersión de luz lateral y frontal. B. Marcado de células CD11c+ sobre la selección de BMDDCs totales.

A continuación, las células CD11c+ CD80+, CD11c+ CD86+, CD11c+ MHC I+, CD11c+ MHC II+, CD11c+ IL-10+, CD11c+ IL-12+, CD11c+ Myd88+ y CD11c+ NF- κ B+ se seleccionaron a partir de las CD11c+ totales (Figura 16).

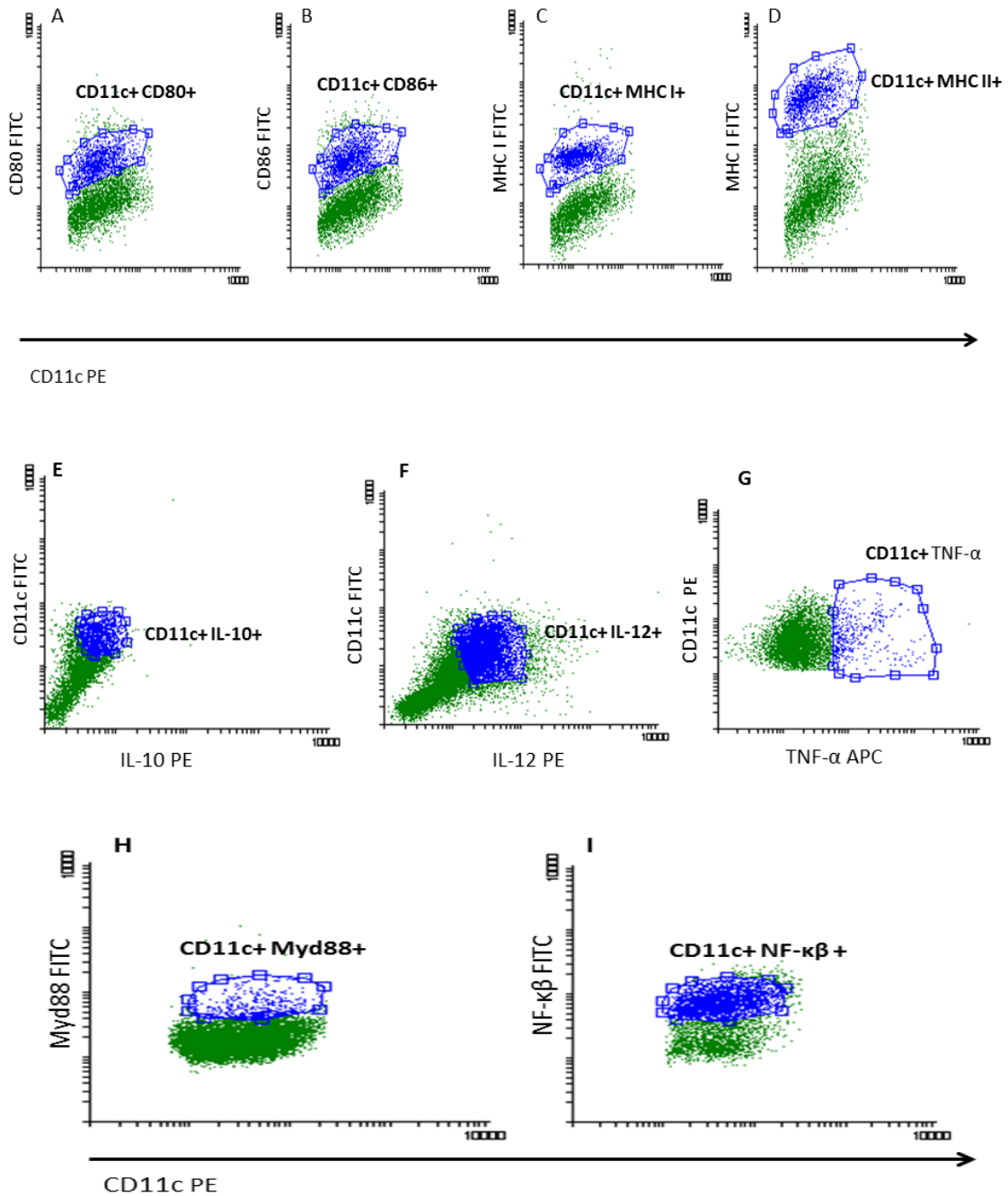


Figura 16. Marcado de células CD80⁺ (A), CD86⁺ (B), MHC I (C), MHC II (D), IL-10⁺ (E), IL-12⁺ (F), TNF- α ⁺ (G), Myd88 (H) y NF- κ B (I), sobre el total de CD11c⁺.

Por último, las células CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁺ y CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁺ se seleccionaron también a partir de las CD11c⁺ totales (Figura 17).

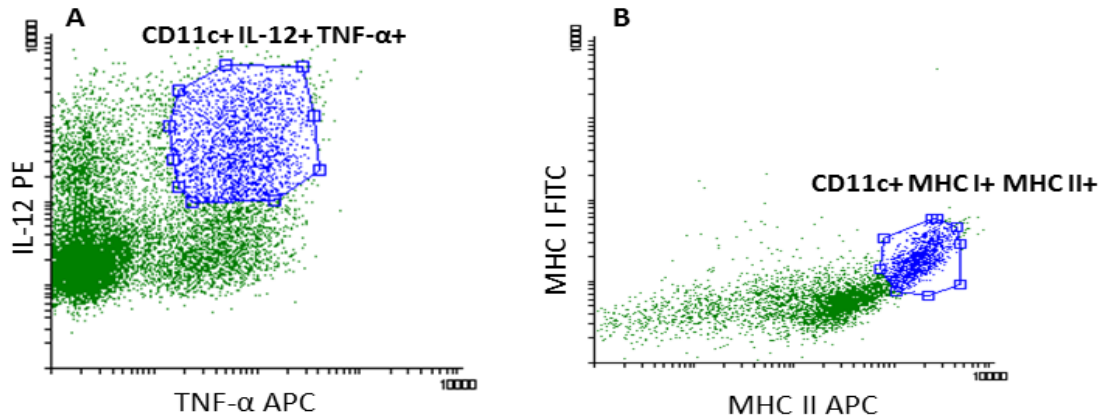


Figura 17. Marcado de células IL-12+ TNF- α + (A) y MHC I+ MHC II+ (B), sobre el total de CD11c+.

En cuanto a la población de células CD11c-, se siguió este mismo protocolo para su selección y posterior análisis.

Análisis estadístico

Todos los datos recogidos se introdujeron en una base de datos y se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los estadísticos descriptivos se expresaron como frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas, y como medias y desviación típica, para las variables continuas (mínimo N=3). Se utilizaron pruebas no paramétricas de comparación de muestras relacionadas (test de Wilcoxon y Test de Monte Carlo) para la comparación de las medias. El nivel de significación asumido fue de $p < 0,05$.

A2.2.) Determinación de los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de BMDDCs estimuladas por los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* mediante ELISA

Las BMDDCs de ambas cepas de ratón, se estimularon a día 6 de maduración, tal y como se ha descrito previamente, con los siguientes antígenos:

- ES y CE de *A. simplex*
- LPS *E. coli* 026B6
- CpG (ODN1826)
- LPS *E. coli* K12
- Pam3CSK4
- HKLM
- FSL-1

- Poly (I:C)
- Poly (I:C) LMW
- ssARN 40
- ST-FLA

Todos ellos se adicionaron a los pocillos solos y acompañados por ES o CE, además del pocillo control, tal y como se ha descrito previamente. El protocolo seguido se describe a continuación:

- Sembrar 200 µl de BMDDCs (1×10^6 células/ml) en placas de 96 pocillos de fondo plano.
- Estimular con los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES o CE, solos y asociados a los agonistas de TLR. En el caso de los ratones C57BL/6 no se testaron FSL-1 ni ssARN 40,
- Incubar 48 h en estufa (37°C, 5% CO₂).
- Recoger los sobrenadantes de cada uno de los pocillos y congelar a – 80°C.

Posteriormente, se determinó la concentración de IL-10 en cada uno de los sobrenadantes mediante *Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go! (2nd Generation) eBioscience*. Se siguieron las instrucciones detalladas por el fabricante:

- Cubrir la placa *Corning Costar 9018 ELISA* con 100 µl/pocillo del anticuerpo de captura en *Coating Buffer*. Sellar la placa e incubar toda la noche a 4°C.
- Retirar los sobrenadantes y lavar tres veces con un volumen superior a 250 µl/pocillo de *Wash Buffer*.
- Bloquear los pocillos con 200 µl/pocillo de *Assay Diluent 1X*. Incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
- Retirar los sobrenadantes y lavar tres veces con un volumen superior a 250 µl/pocillo de *Wash Buffer*.
- Preparar la curva patrón: adicionar 100 µl/pocillo de la concentración *top standard* y realizar diluciones seriadas hasta un total de 8 puntos. Añadir 100 µl/pocillo de cada una de las muestras en los pocillos correspondientes. Sellar la placa e incubar toda la noche a 4°C.
- Retirar los sobrenadantes y lavar tres veces.
- Añadir 100 µl/pocillo del anticuerpo de detección diluido en *Assay Diluent 1X*. Sellar placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

- Retirar los sobrenadantes y lavar tres veces.
- Añadir 100 µl/pocillo de *Avidin-HRP* diluida en *Assay Diluent 1X*. Sellar la placa e incubar durante 30 minutos.
- Retirar los sobrenadante y lavar tres veces.
- Añadir 100 µl/pocillo de *Substrate Solution* en cada pocillo. Incubar la placa en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Añadir 50 µl/pocillo de *Stop Solution* en cada pocillo.
- Leer la placa a 450 nm y 570 nm (restar los valores obtenidos a 570 nm a las lecturas a 450 nm y se analizar los datos).
- A partir de la curva patrón, por regresión lineal, se calculó la ecuación de una recta ($y=0,0003x + 0,0457$, $R^2=0,9976$). Se extrapolaron las concentraciones correspondientes de IL-10 (pg/ml) a partir de las absorbancias obtenidas.

Análisis estadístico

Todos los datos recogidos se introdujeron en una base de datos y se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6.0. La media y desviación estándar se determinaron, para cada grupo (N=2), y se compararon mediante la prueba ANOVA de una vía. El nivel de significación asumido fue de $p < 0,05$.

B) Estudio de los efectos producidos por los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre distintos marcadores celulares en linfocitos vírgenes extraídos de bazo de ratón

Se emplearon dos técnicas para la caracterización de linfocitos bajo los efectos de los antígenos larvarios de *A. simplex*:

- Citometría de Flujo: permitió el estudio de distintas poblaciones linfocitarias.
- Espectrofluorimetría con resazurina: para determinar el cambio en la capacidad linfoproliferativa de los linfocitos.

B1) Estudio de los cambios producidos en las poblaciones de linfocitos (CD4, CD8, CD25) co-cultivados con BMDDCs previamente estimuladas mediante Citometría de Flujo

En primer lugar, la suspensión celular extraída del bazo se adicionó sobre BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE, durante 24 h, del siguiente modo:

- Preparar una suspensión de 5×10^6 linfocitos/ml en medio RPMI con suero.
- Adicionar 1 ml de dicha suspensión sobre cada uno de los pocillos que contienen las BMDDCs (1×10^6 células/ml). De tal modo que quede una relación linfocitos/BMDDCs 5:1.
- Incubar en estufa (CO_2 5%, 37°C) durante 48 h.

Tras las 48 h de incubación, se recogieron los sobrenadantes del co-cultivo, en donde se encontrarían los linfocitos suspendidos, y se determinaron los siguientes marcadores mediante citometría de flujo (Tabla 8):

Tabla 8. Muestra los marcadores estudiados por CMF en linfocitos de ratón.

| Moléculas de superficie | Citocinas Intracelulares | Factores de transcripción |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| CD4 | IL-10 | Foxp3 |
| CD8 | IL-12 | |
| CD25 | IFN- γ | |

Se fijaron y se tiñeron mediante CMF, siguiendo el protocolo que se detalla:

Anticuerpos monoclonales empleados

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

- *PerCP Rat Anti-Mouse CD4* (BD-Pharmingen). Se une específicamente al antígeno de diferenciación **CD4** (L3T4), propio de la mayoría de linfocitos T maduros (células T helper restringidas a MHC II y células T reguladoras) y linfocitos NKT. También se ha descrito su expresión en precursores de linfocitos B y células pluripotenciales de la médula ósea de la línea mieloide. Actúa como correceptor en la activación de los linfocitos T CD4, interactuando con las moléculas MHC II expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígenos.
- *PerCP Rat Anti-Mouse CD8a* (BD-Pharmingen). Se une a la cadena α de la molécula **CD8** de ratón. Esta molécula se expresa en la mayoría de timocitos y en la subpoblación de linfocitos T maduros restringidos por la molécula MHC I, así como en linfocitos T citotóxicos. Además, CD8a es expresado por linfocitos T $\gamma\delta$ y CDs sin CD8b. CD8 es un correceptor de los linfocitos T que participa en su activación mediante la unión y reconocimiento de MHC I en la superficie de las células presentadoras de antígeno y células epiteliales.
- *Anti-Mouse CD25 APC* (eBioscience). Este anticuerpo es capaz de reconocer la molécula **CD25** de ratón, que es la cadena α del receptor de la IL-2. CD25 se expresa por los progenitores de los linfocitos T y B, así como linfocitos T y B activados. CD25 por sí mismo presenta baja afinidad por la IL-2, pero alta afinidad CD122 (cadena β del receptor de la IL2). Este complejo presenta una alta afinidad por la IL-2. CD25 participa en la diferenciación y proliferación de los linfocitos.

- *Anti-Mouse IFN gamma PE* (eBioscience). Se une al IFN- γ de ratón, citocina producida por linfocitos T y B activados, y células NK. Es una citocina con actividad frente a virus y parásitos. Además, presenta sinergia con otras citocinas como TNF- α , inhibe la proliferación celular y presenta efectos inmunomoduladores del sistema inmunitario.
- *PE Rat Anti-Mouse IL-10* (BD Pharmingen). Explicado previamente.
- *Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set PE* (eBioscience). Reconoce la molécula Foxp3 de rata, perro, cerdo y oveja. Foxp3 es un factor de transcripción presente en linfocitos T reguladores CD4+CD25+, así como en linfocitos T CD4+CD25-, a los que también dota de fenotipo regulador.

Combinación de los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se combinaron de la siguiente manera (Figura 18):

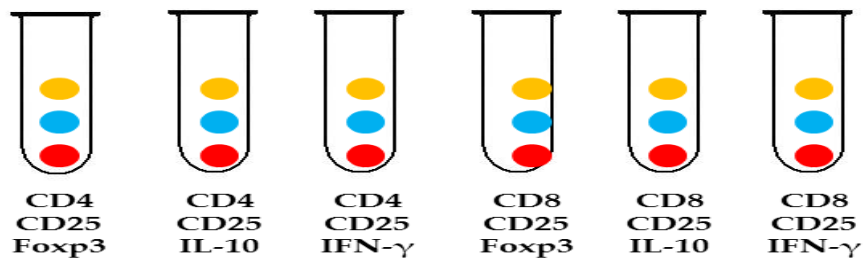


Figura 18. Representa las distintas asociaciones de los anticuerpos empleados. Los colores indican el tipo de fluorocromo empleado: Naranja (PerCP), Azul (APC), Rojo (PE).

Tinción de marcadores de superficie

Se siguieron los mismos protocolos de citometría empleados para las BMDDCs, a excepción de que la fijación de los linfocitos se realizó con paraformaldeído al 2%.

Tinción intracelular de citocinas

El protocolo de tinción intracelular para citometría de flujo llevado a cabo fue el mismo que el empleado para las BMDDCs, previamente explicado. Solo se diferenciaron en:

- La Brefeldina A (10 ng/ml) se adicionó a cada uno de los pocillos tras 36 horas del inicio del co-cultivo y se la dejó actuar 12 horas.
- La fijación de los linfocitos se realizó con paraformaldeído al 2%.

Tinción intracelular de factores de transcripción

En este caso, se empleó el *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience), para la tinción intracelular de dicho factor de transcripción. Se siguió, por tanto, las instrucciones especificadas de este *kit*:

- Tras fijar y realizar la correspondiente tinción de los marcadores de superficie (CD4, CD8, CD25), permeabilizar los linfocitos con la solución de trabajo proporcionada por el *kit*. Incubar a 4°C y en oscuridad, durante 18 h.
- Lavar, y adicionar el anticuerpo anti-Foxp3 (*Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set PE*, eBioscience) a la 1/1000 en el tampón de permeabilización. Incubar 40 minutos a 4°C en oscuridad.
- Lavar, y resuspender en un tampón proporcionado por el *kit* (100 µl). Transferir a los tubos de citometría.

Adquisición de los datos

Para la calibración, compensación y adquisición de los datos se emplearon los mismos programas y equipos de citometría indicados anteriormente.

Análisis de datos

Al igual que en el apartado anterior, para el análisis de los datos generados por la CMF se utilizaron los programas descritos previamente (*WinMDI 2.9.* y *Flowing software*). El formato empleado mayoritariamente fue el *Dot-Plot*. El análisis estadístico igualmente se realizó con el programa *GraphPad Prism*.

Se realizó la selección de linfocitos CD4+ o CD8+ totales según las características de la dispersión de la luz frontal y lateral así como la expresión de CD4 o CD8, respectivamente (Figura 19).

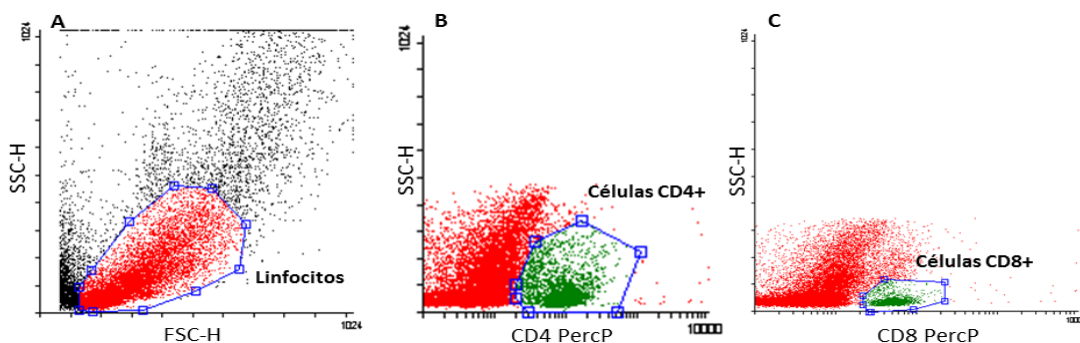


Figura 19. A. Selección de linfocitos totales derivados de esplenocitos de ratón, mediante los parámetros de dispersión de luz lateral y frontal. B. Marcado de células CD4+ sobre la selección de linfocitos totales. C. Marcado de células CD8+ sobre la selección de linfocitos totales.

Después, las poblaciones CD4⁺ CD25⁺ y CD8⁺ CD25⁺ se seleccionaron a partir de las CD4⁺ o CD8⁺ totales (Figura 20).

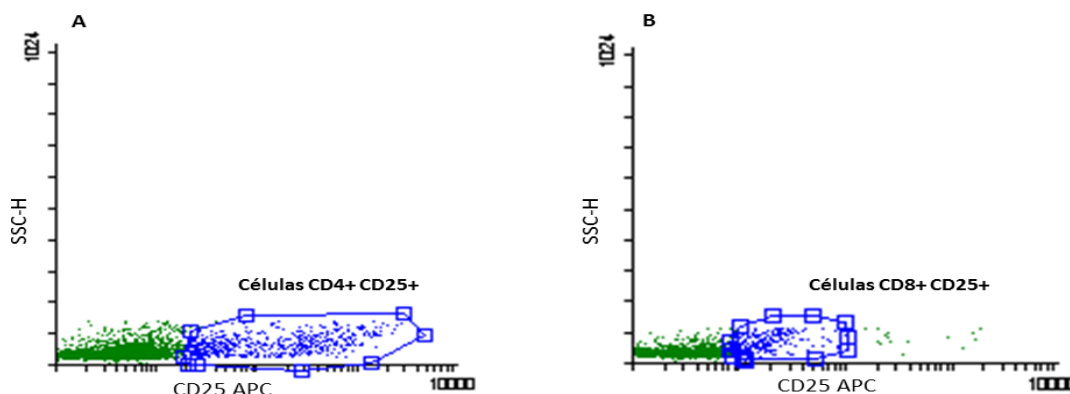


Figura 20. A. Marcado de células CD4⁺ CD25⁺ sobre la selección de células CD4⁺ totales. B. Marcado de células CD8⁺ CD25⁺ sobre la selección de células CD8⁺ totales.

Finalmente, las poblaciones CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, CD4⁺ CD25⁺ IL-10⁺, CD4⁺ CD25⁺ IFN- γ ⁺ así como CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, CD8⁺ CD25⁺ IL-10⁺ y CD8⁺ CD25⁺ IFN- γ ⁺ se escogieron a partir de las subpoblaciones CD4⁺ CD25⁺ y CD8⁺ CD25⁺ totales, respectivamente (Figura 21).

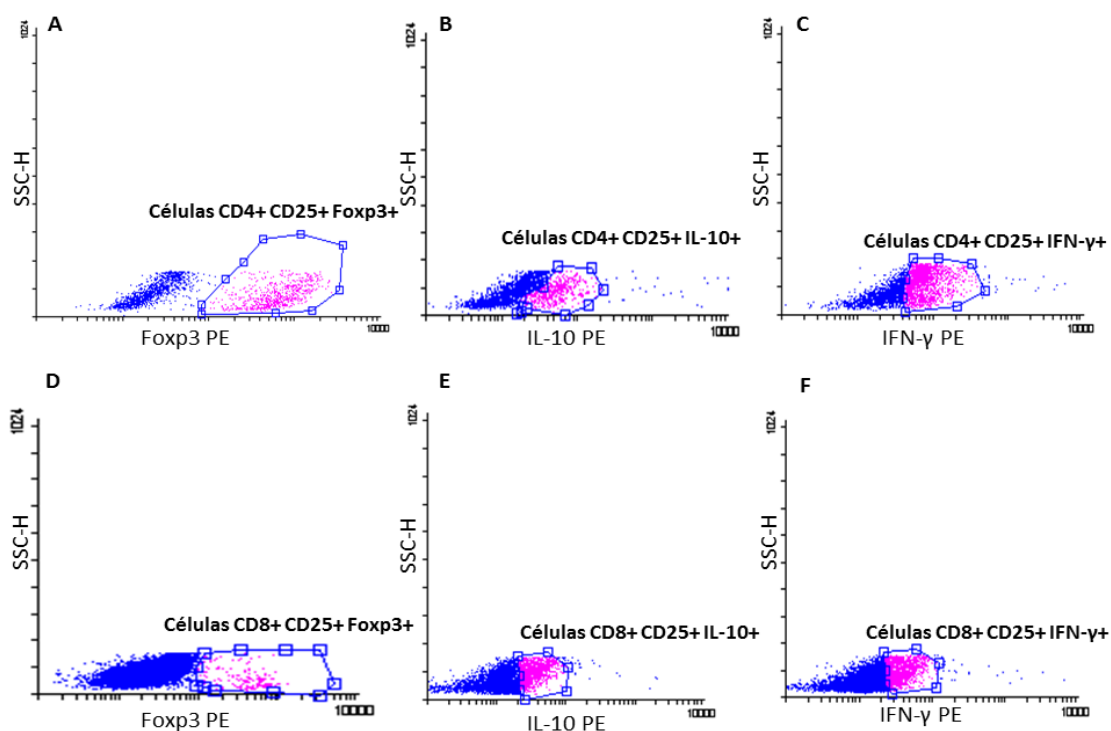


Figura 21. A. Marcado de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ sobre la selección de células CD4⁺ CD25⁺ totales. B. Marcado de células CD4⁺ CD25⁺ IL-10⁺ sobre la selección de células CD4⁺ CD25⁺ totales. C. Marcado de células CD4⁺ CD25⁺ IFN- γ ⁺ sobre la selección de células CD4⁺ CD25⁺ totales. D. Marcado de células CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ sobre la selección de células CD8⁺ CD25⁺ totales. E. Marcado de células CD8⁺ CD25⁺ IL-10⁺ sobre la selección de células CD8⁺ CD25⁺ totales. F. Marcado de células CD8⁺ CD25⁺ IFN- γ ⁺ sobre la selección de células CD8⁺ CD25⁺ totales.

De igual manera, se analizaron las poblaciones CD4+CD25- y CD8+CD25- a partir de las CD4+ o CD8+ totales. Después, las poblaciones CD4+ CD25- Foxp3+, CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ + así como CD8+ CD25- Foxp3+, CD8+ CD25- IL-10+ y CD8+ CD25- IFN- γ + se escogieron a partir de las subpoblaciones CD4+ CD25- y CD8+ CD25- totales, respectivamente.

Análisis estadístico

Todos los datos recogidos se introdujeron en una base de datos y se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6.0. La media y desviación típica se determinaron, para cada grupo (N=3), y se compararon mediante la prueba ANOVA de una vía. El nivel de significación asumido fue de $p < 0,05$.

B2) Estudio de los efectos producidos tras la estimulación sobre la linfoproliferación mediante espectrofluorimetría. Ensayos de linfoproliferación con resazurina

Se estudió el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, sobre la capacidad linfoproliferativa de linfocitos vírgenes obtenidos de bazo de ratón mediante método espectrofluorimétrico con resazurina. Se siguió el protocolo descrito:

- Extraer los linfocitos del bazo de un ratón tal y como se ha explicado previamente.
- Dejar reposar 2-3 h en tubo estéril de 50 ml en estufa (CO₂ al 5%, 37°C).
- Realizar recuento en cámara de Neubauer con Azul Tripán, y preparar una suspensión de $7,5 \times 10^5$ linfocitos/ml en RPMI con suero.
- Transferir 200 μ l/pocillo (150,000 linfocitos/pocillo) de dicha suspensión en tres placas: Placa 1, Placa 2 y Placa 3, de 96 pocillos de fondo en forma de U.
- Estimular las 3 placas de forma idéntica, de la siguiente manera (Figura 22):

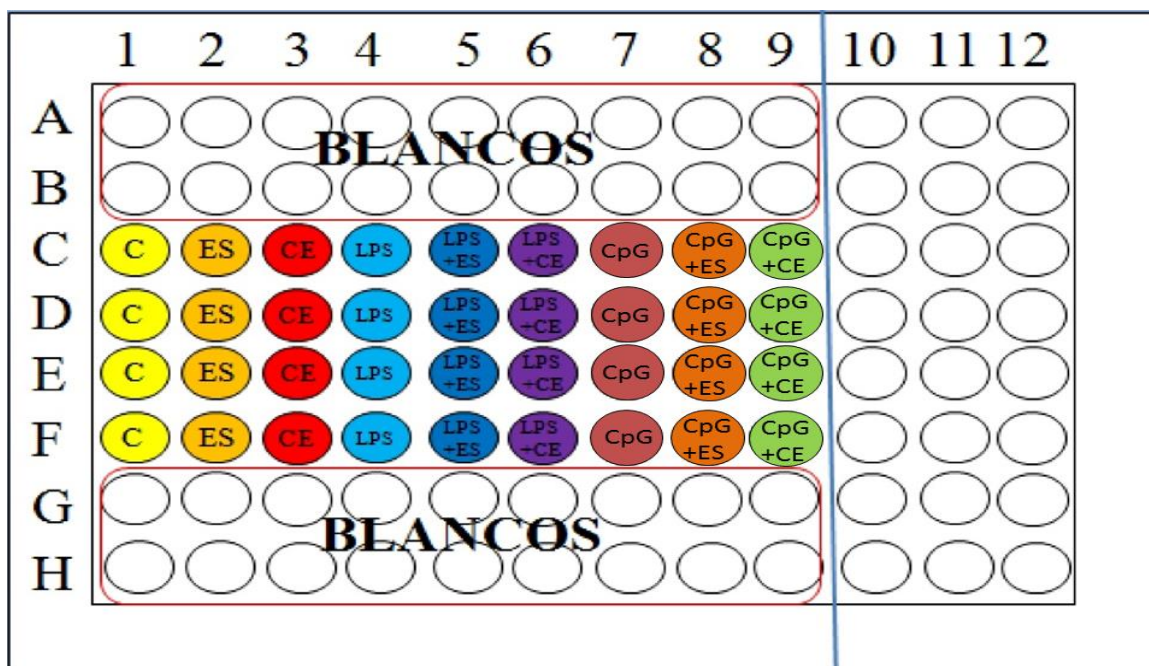


Figura 22. Esquema seguido en la distribución de los antígenos ensayados, así como los pocillos control y los blancos, en las placas 1, 2 y 3. C, control; ES, antígeno excretor-secretor de *Anisakis simplex*; CE, antígeno total de *A. simplex*; LPS, LPS *E. coli* 026B6; CpG, CpG (ODN1826).

- Incubar las Placas 2 y 3 en estufa a 37°C durante 24 h.
- En la Placa 1, añadir 20 µl/pocillo del colorante redox resazurina preparado *in situ* (10 mM), quedando una concentración final de 1 mM en cada pocillo.
- Realizar las lecturas en el espectrofluorímetro (Infinite 200, TECAN) a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 535 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ de 590 nm a los distintos tiempos establecidos: de 1 a 9 horas, cada hora, y de 17 a 24 horas, cada hora, desde la adición de la resazurina. A lo largo de todo el intervalo de tiempo ensayado, mantener la placa en estufa a 37°C y 5% de CO₂.
- Tras 24 h desde el inicio de la estimulación, adicionar la resazurina del mismo modo que en la Placa 1, en la Placa 2.
- Realizar las lecturas en el espectrofluorímetro a los siguientes tiempos: de 1 a 14 horas, cada hora, y a las 24 h, desde la adición de la resazurina. A lo largo de todo el intervalo de tiempo ensayado, mantener la placa en estufa a 37°C y 5% de CO₂.
- A las 48 h desde el comienzo de la estimulación, añadir la resazurina a la Placa 3.
- Realizar las lecturas en el espectrofluorímetro de 1 a 11 h, cada hora, y a las 24 h, desde la adición de la resazurina. A lo largo de todo el intervalo de tiempo ensayado, mantener la placa en estufa a 37°C y 5% de CO₂.

Todos los antígenos se evaluaron por cuádruplicado en un único ensayo y en ambas cepas de ratones (BALB/c y C57BL/6). En todos los ensayos se incluyeron cuatro filas de control blanco en la que solo se añade la resazurina en PBS 1X. Este control interno permite corroborar que la fluorescencia en los pocillos se debe a la viabilidad de los linfocitos y no a falsos negativos producidos por el medio de cultivo empleado.

Análisis estadístico

Todos los datos recogidos se introdujeron en una base de datos y se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6.0. La media y desviación típica se determinaron, para cada grupo (N=4), y se compararon mediante la prueba ANOVA de dos vías. El nivel de significación asumido fue de $p < 0.05$.

2.3. Métodos empleados en muestras humanas

Se realizaron dos estudios en humanos, coordinados y dirigidos por el Dr. Juan Carlos Andreu Ballester, junto con los Hospitales Arnau de Vilanova y Doctor Peset Alexandre de Valencia (España). Se empleó el suero para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* (IgG, IgM, IgA, IgS, IgE) y sangre para el análisis mediante CMF de una serie de poblaciones linfocitarias.

2.3.1. Estudio de los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en suero de pacientes sanos y su relación con células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$

A) Población de estudio

Se ha realizado un estudio prospectivo de Enero a Diciembre del año 2013.

Se reclutaron un total de ciento treinta y dos sujetos sanos seleccionados entre los familiares de pacientes ingresados en el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia (España), así como de los propios trabajadores del Hospital.

Los sujetos incluidos en el estudio debían cumplir los siguientes criterios: no presentar enfermedad infecciosa actual, no tener inmunodeficiencia conocida, no padecer enfermedad autoinmunitaria, no haber sido vacunados en los últimos seis meses, no recibir tratamiento inmunosupresor y/o antibiótico, en los seis meses previos.

Todos los participantes en el estudio firmaron un su consentimiento informado, así como el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital aprobó el estudio (documento no 20/2012).

B) Variables analizadas

- **Varibales demográficas:** edad y género.
- **Variables analíticas:** se realizaron varias determinaciones que se indican a continuación.
 - Inmunoglobulinas específicas frente a *A. simplex*: IgG, IgM, IgA, IgE e inmunoglobulinas totales (IgS).
 - Se analizaron las siguientes poblaciones linfocitarias: CD3+, CD3+ CD4+, CD3+ CD8+, CD3+ CD56+, CD3+ $\alpha\beta$, CD3+ CD4+ $\alpha\beta$, CD3+ CD8+ $\alpha\beta$, CD3+ CD56+ $\alpha\beta$, CD3+ $\gamma\delta$, CD3+ CD8+ $\gamma\delta$, CD3+ CD56+ $\gamma\delta$, CD19+.

C) Estudio de poblaciones linfocitarias mediante Citometría de Flujo

Las muestras de sangre se procesaron como se describe a continuación:

1. Todas las muestras de sangre periférica se obtuvieron mediante venopunción. Se conservaron en presencia del anticoagulante K3-EDTA y fueron procesadas a las seis horas de su recolección.
2. El recuento de células sanguíneas se realizó mediante el equipo Coulter LH750 Analizador automatizado hematológico (Beckman Coulter, Fullerton, CA).
3. A continuación, las muestras de sangre se prepararon para CMF.

Anticuerpos monoclonales empleados

A continuación se describen brevemente los anticuerpos monoclonales empleados.

- **CD45.** Se empleó el anticuerpo monoclonal CD45 (Beckman Coulter, Miami, USA [clon:J33]). Las moléculas de CD45 son proteínas de membrana de cadena simple que están presentes en la superficie de los leucocitos humanos: linfocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos y neutrófilos en orden de expresión decreciente. Es un componente esencial en la membrana de los linfocitos.
- **CD3.** Se utilizó el anticuerpo monoclonal CD3 (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: UCHT1]). El antígeno CD3 es un complejo que incluye al receptor de la célula T (TCR). Se expresa en células T maduras y timocitos. La activación de las células T se puede inducir cuando un antígeno extraño se presenta al TCR a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).
- **CD4.** Se utilizó el anticuerpo monoclonal CD4 (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: SFC12T4D11]). CD4 es una glicoproteína transmembranal que se une a moléculas

del MHC tipo II y es correceptor en la activación inducida por antígenos con restricción MHC tipo II. CD4 se expresa en linfocitos T colaboradores. También se coexpresa con CD8⁺ en la mayoría de los timocitos, y a niveles bajos, en monocitos. Los linfocitos T CD4⁺ inducen y ayudan activamente en la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B.

- **CD8.** Se empleó el anticuerpo monoclonal CD8 (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: B9.11]). CD8 es un dímero disulfuro que existe como homodímero CD8 α o como heterodímero CD8 $\alpha\beta$. CD8 reconoce las moléculas MHC tipo I y se expresa en un subgrupo de linfocitos de sangre periférica así como, en menor intensidad, en los linfocitos *Natural Killer* (NK). El homodímero CD8 α se expresa en células NK y LT $\gamma\delta$. La molécula CD8 actúa junto con el receptor de la célula T (TCR) como correceptor para el reconocimiento de MHC tipo I. CD8 se emplea para el reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos.

- **CD56.** Se empleó el anticuerpo monoclonal CD56 (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: N90] (NKG-1)). El antígeno CD56 se expresa de forma moderada en una población de linfocitos grandes granulares de sangre periférica y en todas las células NK. También se expresa en un subgrupo de linfocitos T. No es expresado por granulocitos, monocitos ni linfocitos B.

- **CD19.** Se empleó el anticuerpo monoclonal CD19 (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: J3-119]). Es una glicoproteína de membrana implicada en el desarrollo, activación y diferenciación de los linfocitos B. Es expresada por todos los linfocitos B incluyendo linfocitos pro-B, aunque se pierde en la maduración a célula plasmática. Además puede encontrarse en la superficie de CDs foliculares. No se expresa en linfocitos T, células NK, monocitos ni granulocitos.

- **Receptor de la célula T pan $\gamma\delta$.** Se empleó el anticuerpo monoclonal IgG1 murino anti TCR- $\gamma\delta$ humano conjugado con ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: IMMU 510]). Este anticuerpo permite la identificación y numeración de poblaciones celulares que expresan el antígeno TCR- $\gamma\delta$ en muestras humanas mediante CMF. Este anticuerpo reconoce todas las subpoblaciones $\gamma\delta$ independientemente de las regiones variables que expresen. Tiñe entre el 1,6% a 8,9% de los linfocitos T de sangre periférica de muestras de donantes sanos.

- **Receptor de la célula T pan $\alpha\beta$.** Se empleó el anticuerpo monoclonal anti TCR- $\alpha\beta$ humano (Beckman Coulter, Miami, USA [clon: IP26A]) conjugado con PC5. Reconoce un determinante monomórfico de la cadena $\alpha\beta$ del complejo TCR. Tiñe del 89,4% a 98,4% de las células CD3⁺ en sangre normal.

Combinación de anticuerpos monoclonales

Las muestras de sangre se tiñeron con las siguientes combinaciones de anticuerpos:

- CD8⁺ FITC, Anti TCR- $\alpha\beta$, CD45 ECD, CD3 PC5, CD4 PC7
- CD8⁺ FITC, Anti TCR- $\gamma\delta$, CD45 ECD, CD3 PC5, CD4 PC7

- CD5+ FITC, CD56 PE, CD45 ECD, CD3 PC5, CD19 PC7
- Anti TCR- $\gamma\delta$, Anti TCR- $\alpha\beta$, CD45 ECD, CD3 PC5, CD56 PC7

Tinción de marcadores de superficie en células sanguíneas humanas

La sangre se tiñó por cuádruplicado con los correspondientes anticuerpos empleando inmunofluorescencia directa con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45, CD4, CD8, CD56, CD3, CD19, TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$. Los anticuerpos monoclonales empleados estaban conjugados con los siguientes fluorocromos: Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Ficoeritrina rojo de Texas (ECD), y R-ficoeritrina cianina 5 (PC5). Las poblaciones de linfocitos T, $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$, se analizaron con los anticuerpos anti-TCR- $\gamma\delta$ humano PC5 (Beckman Coulter, Miami, USA [clone: IMMU510]) y anti-TCR- $\alpha\beta$ humano PC5 (Beckman Coulter [clone: IP26A]).

El protocolo de fijación y tinción para CMF fue el siguiente:

- Distribuir la muestra en cuatro tubos de polietileno rotulados (100 μ l sangre/tubo).
- Adicionar 20 μ l (FITC y PE) o 10 μ l (ECD) de los correspondientes anticuerpos en cada uno de los tubos. Agitar por vórtex.
- Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos.
- Adicionar un tampón comercial para lisar los eritrocitos y fijar las células de la muestra al mismo tiempo (VersaLyse, BeckmanCoulter, Inc). Agitar por vórtex e incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Realizar tres lavados consecutivos mediante centrifugación a 150 g, retirada de sobrenadante y adición de 3 ml de PBS, en el último lavado, adicionar 0,5 ml of PBS
- Transferir a los tubos para citometría de flujo.

Adquisición y análisis de los datos

Para la adquisición de los datos se empleó un el Analizador de Citometría de Flujo Cytomics FC 500, Florida (USA) (Beckman-Coulter). Se analizaron un mínimo de 30,000 eventos. El análisis posterior se realizó con CXP Software.

La selección de los linfocitos totales se llevó a cabo según sus características de dispersión de luz frontal y lateral así como la expresión de CD45 y dispersión de la luz lateral. Después, se seleccionaron los linfocitos T CD3+, CD3+ CD4+, CD3+ CD8+, CD3+ CD56+ y CD19+. Los linfocitos CD3+ $\alpha\beta$ y CD3+ $\gamma\delta$ se seleccionaron respecto a la

selección de linfocitos totales previa. Después, los linfocitos CD3+ CD4+ $\alpha\beta$, CD3+ CD8+ $\alpha\beta$ y CD3+ CD56+ $\alpha\beta$ se seleccionaron sobre la preselección de los linfocitos CD3+ $\alpha\beta$. Del mismo modo los linfocitos CD3+ CD4+ $\gamma\delta$, CD3+ CD8+ $\gamma\delta$ y CD3+ CD56+ $\gamma\delta$ se seleccionaron desde la preselección de los linfocitos CD3+ $\gamma\delta$.

D) Estudio de los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en suero de sujetos sanos mediante ELISA

- **Determinación de IgM, IgG, IgA e IgS anti-*Anisakis simplex***

Se determinaron los niveles de anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgS) anti-*A. simplex* en suero humano mediante una técnica de ELISA estandarizada en nuestro laboratorio (Daschner *et al.*, 2002; Gutiérrez y Cuéllar, 2002), tal y como se describe a continuación:

- Tapizar las placas de 96 pocillos (Costar, Corning, NY, USA) adicionando 100 μ l/ pocillo de antígeno larvario CE (10 μ g/ml) diluido en tampón carbonato 0,1 M a pH 9.6. Incubar toda la noche a 4°C.
- Lavar tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05 % (PBS-Tween).
- Bloquear con 200 μ l/pocillo de BSA al 0,1 % en PBS, durante 1 h a 37°C.
- Lavar tres veces con PBS-Tween.
- Añadir 100 μ l de los sueros humanos por duplicado y a una dilución 1/100 en PBS-Tween, con BSA al 0,1%. Incubar 2 h a 37°C.
- Retirar los sueros y lavar de nuevo tres veces con PBS-Tween.
- Adicionar 100 μ l/pocillo de los siguientes anticuerpos de cabra anti-humanos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) contra IgS (1/10000), IgM (1/8000), IgG (1/8000) or IgA (1/3000) (Biosource International, Camarillo, CA, USA).
- Lavar tres veces con PBS-Tween.
- Añadir 100 μ l/pocillo del sustrato (o-fenileno diamina al 0,04 % en tampón citrato fosfato con H₂O₂ al 0,04 %), y dejar actuar 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- Parar la reacción 50 μ l/pocillo con ácido sulfúrico 3 N.
- Leer a 490 nm mediante un espectrofotómetro (ELX808, Biotek).

De forma paralela y simultánea se emplearon sueros humanos positivos y negativos a *A. simplex* como controles. Para la evaluación de los resultados obtenidos se representaron las D.O. de los sueros, una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado (blancos).

- **Determinación de los niveles de IgE específica anti-*Anisakis simplex***

Este protocolo es igual al empleado para la determinación de los niveles de anticuerpos IgS, IgG, IgM e IgA anti-*A. simplex*, hasta el paso en el que se bloquea la placa con BSA, inclusive. A partir de ahí, sigue de la siguiente manera:

- Realizar 3 lavados con PBS-Tween.
- Adicionar los sueros humanos por duplicado y a una dilución de 1/2. Incubar 2 h a 37°C.
- Retirar los sueros y lavar tres veces con PBS-Tween.
- Agregar 100 µl/pocillo de un anticuerpo monoclonal de ratón contra la cadena epsilon de IgE humana (1/1000) (IgG1κ, E21A11, INGENASA, Madrid, Spain). Incubar 2 h a 37°C.
- Lavar por triplicado con PBS-Tween seguido de 100 µl/pocillo de un anticuerpo de cabra contra IgG1 (gamma) de ratón conjugado con HRP (1/1000) (Life Technologies, Grand Island, NY) Incubar 1 h a 37°C.

De aquí en adelante, los pasos a seguir son los mismos que en el protocolo anterior después de añadir el anticuerpo secundario marcado: adición de sustrato, parada de la reacción y lectura. Igualmente, se emplearon sueros controles positivos y negativos, y para la evaluación de los resultados obtenidos se representaron las D.O. como en el caso anterior.

E) **Análisis estadístico**

Todos los datos recogidos se han introducido en una base de datos y se han analizado mediante un programa estadístico, SPSS 1.9.

Se ha comprobado la asunción de distribución normal para las variables continuas mediante pruebas gráficas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asume normalidad, se ha utilizado la *t* de Student o el test ANOVA para la comparación de las medias de las variables cuantitativas. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa, se ha empleado la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney o bien Kruskal Wallis. Se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson's para comparar los niveles de inmunoglobulinas y los subtipos de células T. El nivel de significación asumido ha sido de $p < 0,05$.

2.3.2. Estudio de los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en suero de pacientes con sepsis

A) Población de estudio

Se ha elaborado un estudio retrospectivo de casos y controles con el suero de 114 pacientes que cumplieron los criterios de sepsis en un estudio previo (Andreu-Ballester *et al.*, 2013).

Se realizaron dos grupos, uno de casos y otro de controles.

Los casos debían cumplir lo siguiente para ser incluidos en el estudio:

- Presentar cuadro de sepsis diagnosticada según los criterios internacionales establecidos, así como sus distintos estadios: sepsis sin fallo orgánico o sepsis con fallo orgánico (sepsis grave) (Levy *et al.* 2003; Dellinger *et al.* 2004; Poze *et al.* 2004). Se utilizaron los índices APACHE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) y SOFA (*Sequential Organ Failure Assesment*).
- No tener inmunodeficiencia conocida, no padecer enfermedad autoinmunitaria, no haber sido vacunados en los últimos seis meses y no recibir tratamiento inmunosupresor alguno.

El reclutamiento de los casos se llevó a cabo por el Dr. Juan Carlos Andreu Ballester entre los pacientes que ingresaron en los servicios de Urgencias y en la Unidad de Cuidados Intensivos de los hospitales Arnau de Vilanova y Doctor Peset Aleixandre de Valencia (España).

Por su parte, los controles (97 sujetos) se incorporaron de entre los acompañantes sanos de pacientes que acudieron al hospital, siempre y cuando no fueran familiares de los pacientes (casos) incluidos en el estudio. Para su inclusión debieron cumplir los mismos criterios que los pacientes (casos), con la única diferencia de que, además, no presentaran enfermedad infecciosa alguna.

Cada participante en el estudio, tanto casos como controles, firmó un documento de consentimiento informado. El estudio fue aprobado por los dos Comités Éticos de Investigación de ambos hospitales.

B) Estudio de poblaciones linfocitarias mediante Citometría de Flujo

El protocolo de fijación y tinción seguido para CMF fue el mismo que se ha descrito en el estudio anterior. La única diferencia fueron las poblaciones de células estudiadas.

Tinción de marcadores de superficie en células sanguíneas humanas

La sangre se tiñó por cuádruplicado mediante inmunofluorescencia directa con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45, CD4, CD8, CD56, CD2, CD3, CD19, TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$. Los anticuerpos monoclonales empleados se conjugaron con los siguientes fluorocromos: Isotiocianato de fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Ficoeritrina rojo de Texas (ECD), y R-ficoeritrina cianina 5 (PC5). Las poblaciones de LT $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ se analizaron con los anticuerpos anti-TCR- $\gamma\delta$ humano PC5 (Beckman Coulter, Miami, USA [clone: IMMU510]) y anti-TCR- $\alpha\beta$ humano PC5 (Beckman Coulter [clone: IP26A]).

Adquisición y análisis de los datos

Para la adquisición de los datos se empleó el Analizador de Citometría de Flujo Cytomics FC 500, Florida (USA) (Beckman-Coulter). Se analizaron un mínimo de 50,000 eventos. El análisis posterior se realizó con CXP Software.

C) Determinación de los biomarcadores de sepsis: proteína C reactiva (PCR), tiempo de sedimentación eritrocitaria (ESR), procalcitonina y lactato

Los niveles de los biomarcadores de sepsis analizados se determinaron a través de las siguientes técnicas, según el estudio de Benet Campos (2015):

- Los niveles de proteína C reactiva se midieron en el suero de los pacientes mediante ELISA sándwich (*Vitros Chemistry Products*®). La proteína C reactiva se sintetiza en el hígado y es una de las proteínas de fase aguda. La determinación de su concentración en sangre es de utilidad en la evaluación de los trastornos inflamatorios, tisulares e infecciosos, incluida la sepsis.
- La velocidad de sedimentación globular se determinó mediante fotometría capilar cuantitativa, empleando el TEST 1 (Alifax, Padova, Italy). Se trata de un marcador inespecífico en solitario, pero útil junto con la determinación de otros biomarcadores como la procalcitonina o el lactato, en la detección de procesos inflamatorios .
- Los niveles de procalcitonina se midieron mediante un inmunoensayo "ECLIA" (electroquimioluminiscencia), automatizado en el analizador Cobas e601 (Roche Diagnostics). La procalcitonina es sintetizada por las células C de la glándula tiroides en condiciones normales. Sin embargo, en situaciones de sepsis es sintetizada en tejidos y órganos como bazo e hígado, de tal manera que su concentración en sangre se dispara. Es por tanto un biomarcador útil en el diagnóstico y pronóstico de casos de sepsis, aunque no definitivo.
- El lactato se midió con un equipo ABL800 FLEX (Radiometer Copenhagen), en sangre mediante el análisis de electrolitos por potenciometría directa. La medición de

los niveles de lactato puede ser de gran ayuda en el diagnóstico y la evaluación de la gravedad de la sepsis, así como para monitorizar el avance.

D) Estudio de los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en suero de pacientes con sepsis mediante ELISA

- **Determinación de IgM, IgG, IgA, IgS anti-*Anisakis simplex***

Se determinaron los niveles de anticuerpos (IgM, IgG, IgA, IgS) anti-*A. simplex* en suero humano mediante una técnica de ELISA estandarizada en nuestro laboratorio, tal y como se describió en el estudio anterior.

- **Determinación de los niveles de IgE específica anti-*Anisakis simplex***

Los niveles en suero de IgE anti-*A. simplex* se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo que se ha detallado en el estudio previamente descrito.

E) Análisis estadístico

Todos los datos recogidos se han introducido en una base de datos y se han analizado mediante un programa estadístico, SPSS 1.9.

Se ha comprobado la asunción de distribución normal para las variables continuas mediante pruebas gráficas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asume normalidad, se ha utilizado la *t* de Student o el test ANOVA para la comparación de las medias de las variables cuantitativas. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa, se ha empleado la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson's para comparar los niveles de inmunoglobulinas y los subtipos de células T.

La frecuencia de los subtipos celulares estudiados no presentó una distribución normal. Si bien al transformar los valores a la escala de logaritmos neperianos, sí cumplieron la normalidad, excepto en el caso de las células B ($P = 0,40$). Los valores normales de nuestra población se calcularon mediante la siguiente ecuación: Exponente (logaritmo neperiano de la media $\pm 1.96 \times$ logaritmo neperiano de la desviación estándar) (Tabla 92, apartado correspondiente del capítulo de Resultados). El nivel de significación asumido ha sido de $p < 0,05$.

VI. RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex* SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

En primer lugar, se estudiaron los efectos ejercidos por los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, en células BMDDCs en su día 6 y 9 de maduración, tras 24 h de estimulación.

El protocolo llevado a cabo fue el descrito en los apartados 3.2.2.1. y 3.2.2.2. de Materiales y Métodos. Se empleó como control negativo el medio de cultivo con las células BMDDCs en solitario, sin ningún tipo de tratamiento. Así mismo, se emplearon dos controles positivos: LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826), agonistas de TLR 4 y 9 respectivamente, y cuyo perfil de estimulación es bastante conocido a día de hoy.

De este modo, la acción ejercida por ES y CE solos se comparó siempre con un control negativo. Para estudiar los efectos moduladores de los antígenos larvarios sobre la acción ejercida con los TLR-agonistas empleados como controles positivos, las células se estimularon con ES o CE y LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826), y a su vez, el resultado obtenido se comparó siempre con el ejercido por LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) solos.

1.1. Efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón de la cepa BALB/c a día 6 de maduración

Se analizaron los efectos producidos por los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre las células BMDDCs tras 24 horas de post-estimulación a día 6 de maduración en presencia de GM-CSF, bajo las condiciones descritas anteriormente en la sección 3.2.2.2. de Materiales y Métodos.

1.1.1. Estudio de los cambios producidos en la población de células CD11c+ y CD11c-

En primer lugar, se analizó el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre el desarrollo y diferenciación de las BMDDCs a células CD11c+ respecto al control sin estimular, así como, respecto a los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 9. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar, de células CD11c⁺ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones a día 6 de maduración. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD11c ⁺ (%) | CD11c ⁺ (GMean) |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Control | 32,3±12,8 | 40,4±15,9 |
| ES | 32,8±16,2 | 41±14,4 |
| CE | 40,1±13,5 | 35,7±16,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 31,5±15,4 | 46,9±6,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 32±13,8 | 48,1±6,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 38,3 ±16 | 44,8±10,9 |
| CpG (ODN1826) | 36,1±13,5 | 48,3±7,1 |
| CpG (ODN1826) +ES | 33,5±16,1 | 52±7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 39,8±10,8 | 48,1±10,3 |

Se determinó el aumento o disminución de las poblaciones CD11c⁺ y CD11c⁻ en presencia de ES o CE solos respecto al control, o bien acompañando a LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto a estos mismos solos.

Se observó un aumento de la población CD11c⁺ en presencia de CE estadísticamente significativo respecto al control (Figura 58). Además, la asociación, tanto de ES como de CE, con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) incrementó dicha población respecto a ambos controles positivos en solitario. Las diferencias observadas en ningún caso fueron estadísticamente significativas.

1.1.2 Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86

Se analizaron las poblaciones CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex*. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación.

Ambas poblaciones (CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺) se vieron incrementadas en presencia de ES y CE respecto al control. El incremento respecto al control de la población CD11c⁺ CD80⁺ tras la estimulación con solo CE fue cercano a la significancia ($p=0,05$). Así mismo, el aumento respecto al control en la expresión de CD86 (Gmean) bajo el efecto de CE en solitario fue estadísticamente significativo ($p=0,047$), como se puede observar en la Figura 23.

La combinación de ES y CE con LPS *E. coli* 026B6 apenas originó cambio alguno en la población CD11c⁺ CD80⁺ respecto a la estimulación con LPS *E. coli* 026B6 en solitario, mientras que la población CD11c⁺ CD86⁺ sí experimentó un incremento suave, en ningún caso significativo. Así mismo, la estimulación con CpG (ODN1826) junto a ES o CE, dio lugar a un aumento en ambas poblaciones, excepto en el caso de las células

CD11c⁺ CD80⁺, que se vieron ligeramente disminuidas respecto a los controles positivos al combinarse con CE.

Tabla 10. Se muestra la media en porcentaje (%) e intensidad media de fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|--------------|-----------|------------------|
| Control | 41,9±16,7 | 44,3±8,1 | 45,4±17 | 42,9±7,6 |
| ES | 46±15,2 | 69,8±11,4 | 48,2±14,8 | 40,5±4,2 |
| CE | 54,2±27,3 | 68,8±25,8 | 53,9±22,4 | 47,5±13,3 |
| LPS <i>E. coli</i>026B | 71,3±11,4 | 65,6±10 | 70,5±12 | 65,2±19,7 |
| LPS <i>E. coli</i>026B6+ES | 72,4±12 | 69,8±11,4 | 72,2±10,4 | 69,1±16,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 67,3±39,3 | 68,6±25,8 | 81,4±6,3 | 74,1±16,2 |
| CpG (ODN1826) | 73,3±15,5 | 80,1±25,9 | 71,2±8,3 | 72,8±17,6 |
| CpG (ODN1826)+ES | 77,3±10,1 | 84,3±8,3 | 74,3±6,9 | 79,5±17 |
| CpG (ODN1826)+CE | 64,9±37,1 | 73,8±28,4 | 79,3±4,8 | 77,1±17,3 |

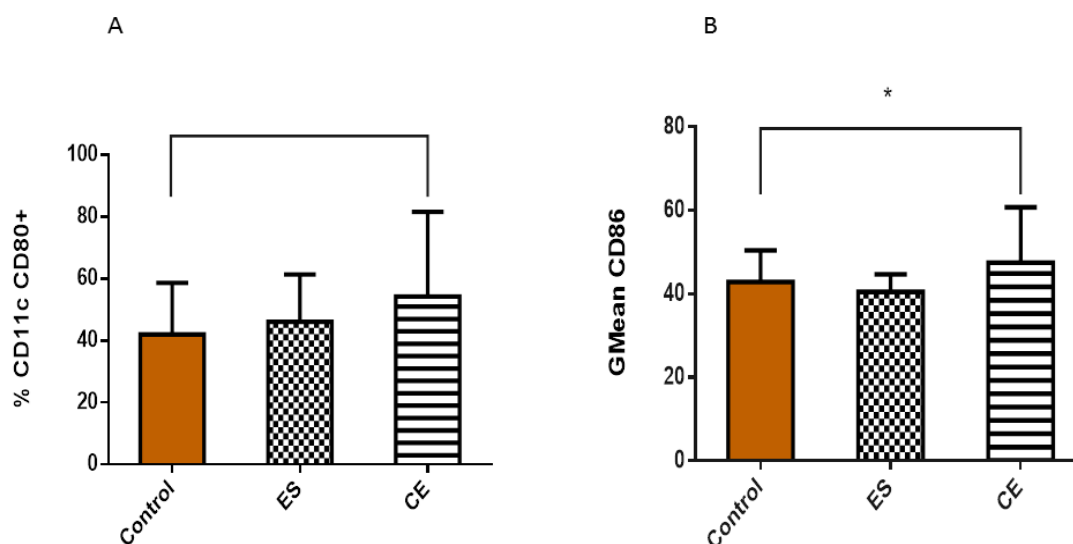


Figura 23. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺ CD80⁺ así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue cercano a la significancia en presencia de CE respecto al control ($p=0,05$). **B.** Muestra la intensidad media de fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86 en la población CD11c⁺, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto al control ($p=0,047$).

Por otro lado, se analizaron las poblaciones CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+. La Tabla 11 recoge los resultados obtenidos.

Tabla 11. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| Control | 8,9±7,9 | 44,4±6 | 6,1±4,2 | 51,9±16,1 |
| ES | 7,7± 6,1 | 42,1±5,8 | 6,1± 4,4 | 50,8±9,8 |
| CE | 14,7±14,4 | 44,2±6,8 | 7,1±5,4 | 47,1±10 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 8,5±5,6 | 53,9±4,6 | 12,2±9,3 | 60,6±14,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 8,6±5,3 | 51,9±4,8 | 10,9±6,6 | 63,1±13,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 13,7±13,9 | 43,2±9,5 | 9,5±5,8 | 48,5±5,3 |
| CpG (ODN1826) | 14,4±13,8 | 59,7±10,5 | 9,9±8,2 | 78±15,1 |
| CpG (ODN1826) +ES | 12±8,8 | 56,5±6,5 | 7±2,7 | 69,9±14,9 |
| CpG (ODN1826) +CE | 12,4±12,6 | 50,4±12,5 | 6,9±4,1 | 51,6±5,4 |

De forma general, apenas hubo modificaciones en las poblaciones de células CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en presencia de los antígenos ES y CE respecto al control, si bien en el caso de la estimulación con solo CE, se pudo apreciar un ligero aumento en ambas poblaciones respecto al control sin estimular.

Por su parte, la asociación de CE con LPS *E. coli* 026B6 dio lugar a un aumento de ambas poblaciones respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario, que en ningún caso fue estadísticamente significativo. La asociación con ES no dio lugar a cambios.

Por último, la asociación de ES y CE con CpG (ODN1826) originó un ligero descenso en las poblaciones CD11c- CD80+ y CD11c- CD86-, que tampoco fue significativo.

1.1.3. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHC II

Se analizaron las poblaciones CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 12. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (Gmean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (GMean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|----------------|--------------------|------------|--------------------|
| Control | 32,1±25,8 | 86,5±57,2 | 67,4±23,4 | 264±202 |
| ES | 31,9±24,1 | 89,9±65 | 70±22,1 | 262,4±195,5 |
| CE | 47,4±26,1 | 83,7±67,3 | 67,5±19,9 | 263±236 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 44,4±33,9 | 98±37,4 | 75,7±19,1 | 305±249,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 45±32,9 | 132,7±118,9 | 76,4±16,2 | 380,5±256,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 59,3±29,5 | 96,5±51,2 | 72,2±22,3 | 293,1±253,6 |
| CpG (ODN1826) | 52,6±34,3 | 118,8±55,7 | 79,8±11 | 317,7±252,4 |
| CpG (ODN1826)+ES | 50,1±31,1 | 89,7±37,5 | 81,9±10,1 | 387,7±283,7 |
| CpG (ODN1826)+CE | 65,8±29,7 | 75,1±30 | 76,6±16 | 280,6±231,1 |

De forma similar a lo ocurrido con las moléculas co-estimuladoras, las poblaciones de células CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ apenas se vieron afectadas por la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex* ES y CE, mientras que los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) las aumentaron respecto al control.

La combinación de LPS *E. coli* 026B6 con ES produjo un incremento estadísticamente significativo de la población de CD11c+ MHC I+ ($p=0,045$), así como de la propia expresión de la molécula de superficie MHC I en dicha población ($p=0,025$), al compararlo con la estimulación producida por LPS *E. coli* 026B6 con solo (Figura 24).

Por el contrario, la asociación tanto de ES como CE con CpG (ODN1826) dio lugar a un descenso en la expresión de la molécula de superficie MHC I en la población CD11c+ MHC I+, siendo dicha reducción estadísticamente significativa en el caso de ES ($p=0,036$) (Figura 25).

En el caso de CE, su combinación con LPS *E. coli* 026B6/ CpG (ODN1826) dio lugar a una menor expresión de MHC II y a un incremento de MHC I. Así, la asociación de CE con LPS *E. coli* 026B6 originó un descenso estadísticamente significativo en la expresión de MHC II en la población CD11c+ MHC II+ ($p=0,012$) (Figura 26).

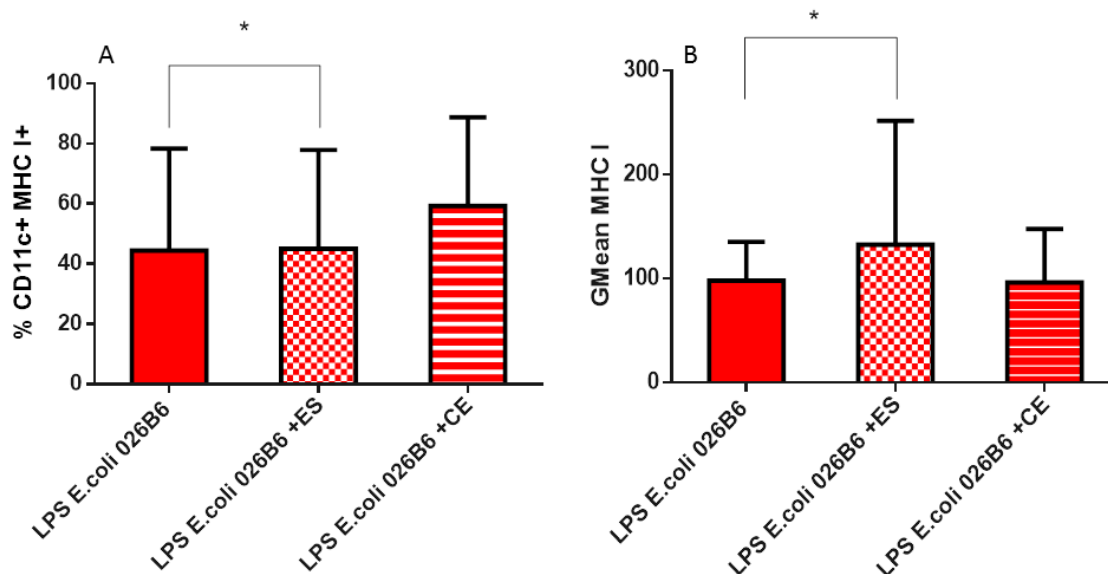


Figura 24. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio de células CD11c+ MHC I+, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES y LPS *E. coli* 026B6 en combinación respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,045$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de MHC I+ en las células CD11c+, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación LPS *E. coli* 026B6, con respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,025$).

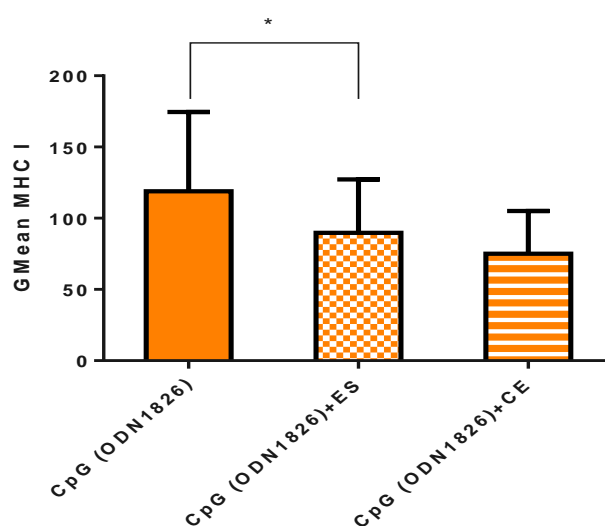


Figura 25. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de MHC I+ en las células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,036$).

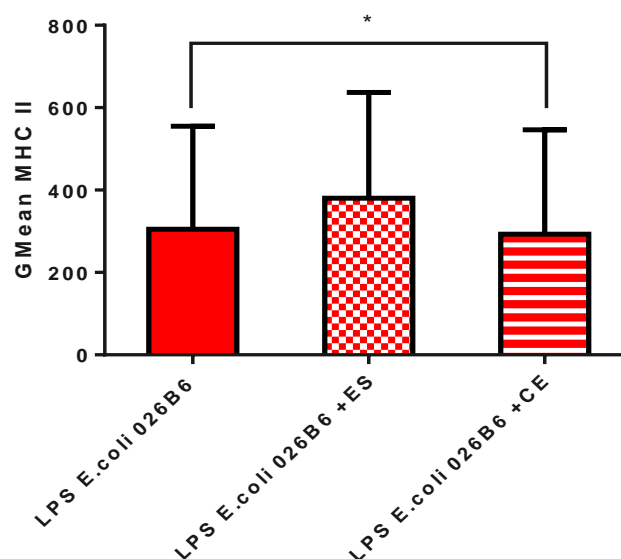


Figura 26. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de MHC II+ en las células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,012$).

En cuanto a la población de células que no expresaron el marcador CD11c (CD11c- MHC I+, CD11c- MHC II+), la Tabla 13 recoge los resultados obtenidos.

Tabla 13. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Además, la expresión de MHC I y MHC II en dichas poblaciones queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (GMean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------|--------------------|
| Control | 9,6±9,1 | 62,2±24,7 | 24,4±18,2 | 203,0±126,2 |
| ES | 9,5±10,5 | 87,4±123,7 | 24,0±19,9 | 174,6±146,6 |
| CE | 16,4±14,3 | 73,7±56,5 | 22,8±14,9 | 154,5±119,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 21,3±28,2 | 167,9±203,3 | 34,7±17,4 | 230,6±137,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 23,4±33,4 | 147,8±84,2 | 35,3±21,0 | 272,8±169,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 34,1±36,5 | 103,2±51,9 | 35,6±18,7 | 182,5±136,6 |
| CpG (ODN1826) | 24,0±31,8 | 102,5±36,8 | 35,7±23,3 | 254,6±138,9 |
| CpG (ODN1826) +ES | 21,9±31,6 | 92,3±51,6 | 34,4±23,5 | 276,1±144,4 |
| CpG (ODN1826) +CE | 31,7±35,3 | 80,8±28,7 | 37,4±22,4 | 182,4±126,6 |

La estimulación con los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, dio lugar a un aumento de la población CD11c- MHC I+, en especial en presencia de CE, así como un aumento en la expresión de la molécula MHC I en dicha población respecto al control. El aumento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en el caso de

CE respecto al control ($p=0,038$). En cuanto a la población CD11c- MHC II+, la estimulación con ES y CE apenas ocasionó cambio alguno en la población respecto al control, mientras que sí originó un descenso en la expresión de MHC II, el cual fue estadísticamente significativo en el caso de ES ($p=0,024$) (Figura 27).

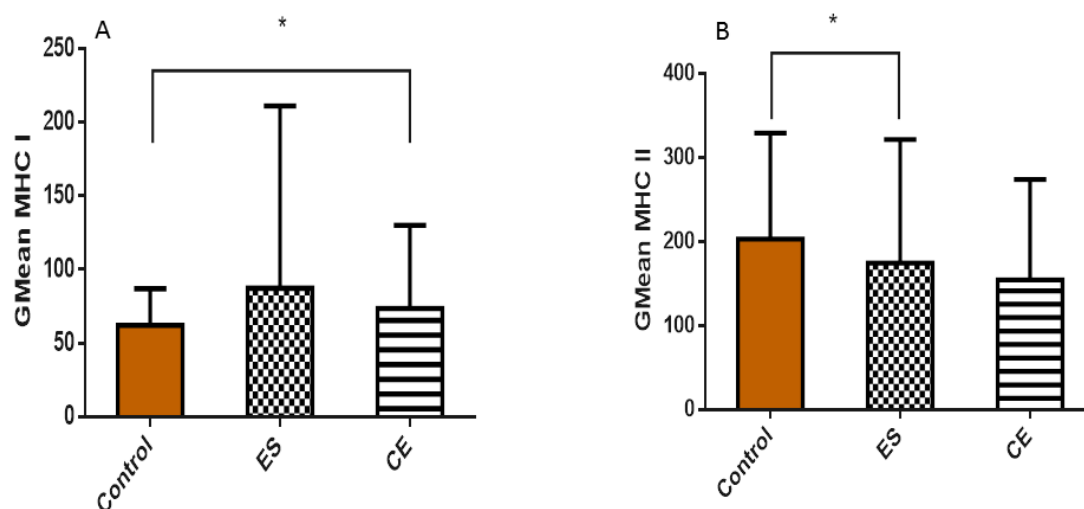


Figura 27. Resultados en ratones BALB/c a día 6 tras 24 h de estimulación. **A.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c-, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto al control ($p=0,038$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto al control ($p=0,024$).

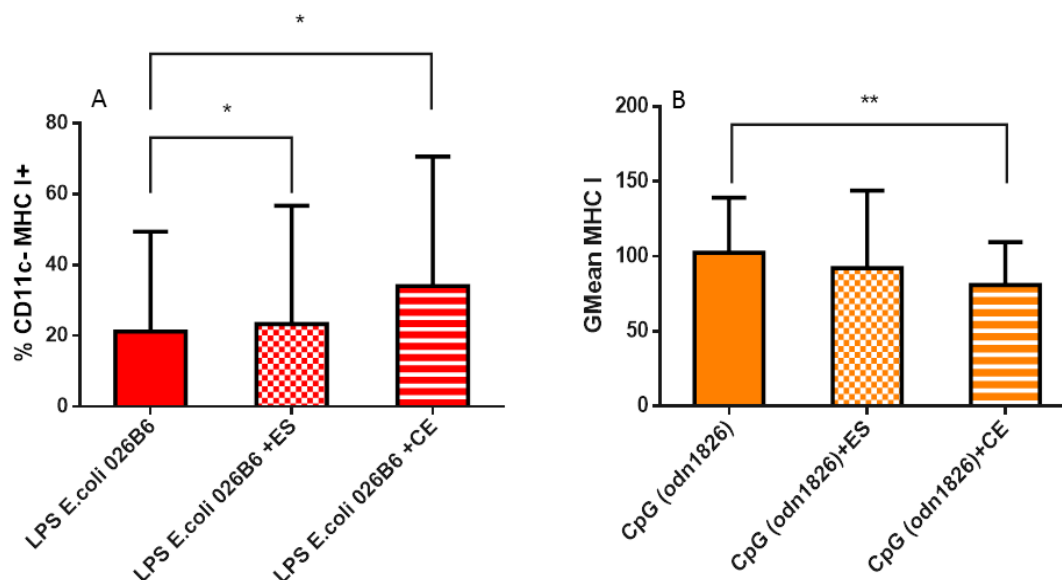


Figura 28. Resultados en ratones BALB/c a día 6 tras 24 h de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,01$, $p=0,011$, respectivamente). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la

expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,006$).

La asociación de LPS *E. coli* 026B6 tanto con ES como con CE dio lugar a un incremento en la población CD11c- MHC I+ que fue estadísticamente significativo en ambos casos ($p=0,01$, $p=0,011$, respectivamente). Por el contrario, la asociación tanto de ES como CE con CpG (ODN1826) ocasionó un descenso en la expresión de MHC I en la población de células CD11c-, que fue estadísticamente significativo en el caso de CE respecto al control ($p=0,006$) (Figura 28).

1.1.4. Estudio de los cambios producidos en la expresión intracelular de las citocinas IL-10 e IL-12

La expresión intracelular de citocinas se determinó a las 12 h y 24 h tras la estimulación. Así, se determinó a ambos tiempos el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+, así como el nivel de expresión intracelular de dichas citocinas en cada población. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 14. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como la desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) 12 h | IL-10 (%) 24 h | IL-10 (Gmean) 12 h | IL-10 (Gmean) 24 h | IL-12 (%) 12 h | IL-12 (%) 24 h | IL-12 (GMean) 12 h | IL-12 (GMean) 24 h |
|--|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | 7±4,7 | 13,1±8,3 | 110,6±116,1 | 44,3±16,7 | 13,7±8,4 | 43,1±25,9 | 45,4±9,9 | 29,7±6,2 |
| ES | 6,7±3,4 | 11,9±9,3 | 154±250,5 | 40,1±10,6 | 13,4±8,6 | 53,8±28,3 | 46,2±10,6 | 32,8±6,2 |
| CE | 7±4,2 | 12,9±9,7 | 177,1±301,5 | 36,3±8,1 | 14,3±7,2 | 52,6±25,1 | 48,4±13,7 | 34±7,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 4,2±3,1 | 15±7,8 | 115,8±123,2 | 39,9±10,5 | 69±7,5 | 54,9±30,2 | 101,9±37,4 | 33,7±5,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 4±3,5 | 14,1±8,3 | 123,4±129,5 | 40,1±10,6 | 67,9±4,4 | 60,2±29,5 | 93,6±30,7 | 34±6,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 3,1±1,7 | 13,7±7,7 | 144,4±163,4 | 36,3±8,1 | 67,7±3,8 | 56±22,9 | 315,9±171,8 | 33,8±7,3 |
| CpG (ODN182 6) | 4,8±3,1 | 19,4±13,1 | 106,6±91 | 38,6±8,1 | 97,7±1 | 62,6±27 | 348,4±171,6 | 36,9±5,2 |
| CpG (ODN182 6) +ES | 4,6±1,2 | 14,6±7,6 | 97,5±92,5 | 40±10,5 | 96±1,4 | 65,2±25,2 | 315,9±171,8 | 37,6±6,1 |
| CpG (ODN182 6) +CE | 3,8±0,6 | 21,2±14,5 | 48,3±8,4 | 35,6±8,2 | 96,5±2,1 | 69,7±24,6 | 310,3±167,4 | 40,6±7,9 |

A las 12 horas tras la estimulación, la adición, tanto de LPS *E. coli* 026B6 como de CpG (ODN1826), supuso un incremento de la población CD11c+ IL-12+, así como de la expresión de IL-12 en dicha población, mientras que, en ambos casos, supuso un descenso de la población CD11c+ IL-10+ respecto al control sin estimular.

Por su parte, la presencia de ES y CE solos no supuso un cambio en el perfil de las poblaciones estudiadas respecto al control. Sin embargo, sí se observó un aumento en la expresión de IL-10 (GMean) en las células CD11c+, que en ningún caso fue estadísticamente significativo.

La combinación de ES y CE con LPS *E. coli* 026B6 no modificó mucho los perfiles de las poblaciones estudiadas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, pero sí que se observó un ligero aumento en la expresión de IL-10 en la población CD11c+, que en ningún caso fue estadísticamente significativo.

En cuanto a la asociación de ES y CE con CpG (ODN1826), estos originaron un suave descenso en la expresión de ambas citocinas en la población CD11c+ respecto al control positivo en solitario. Además, la asociación con ES provocó tanto la disminución de la población CD11c+ IL-12+ como la propia expresión de IL-12 respecto a CpG (ODN1826) solo, siendo este descenso estadísticamente significativo ($p=0,021$, $p=0,007$, respectivamente) (Figura 29).

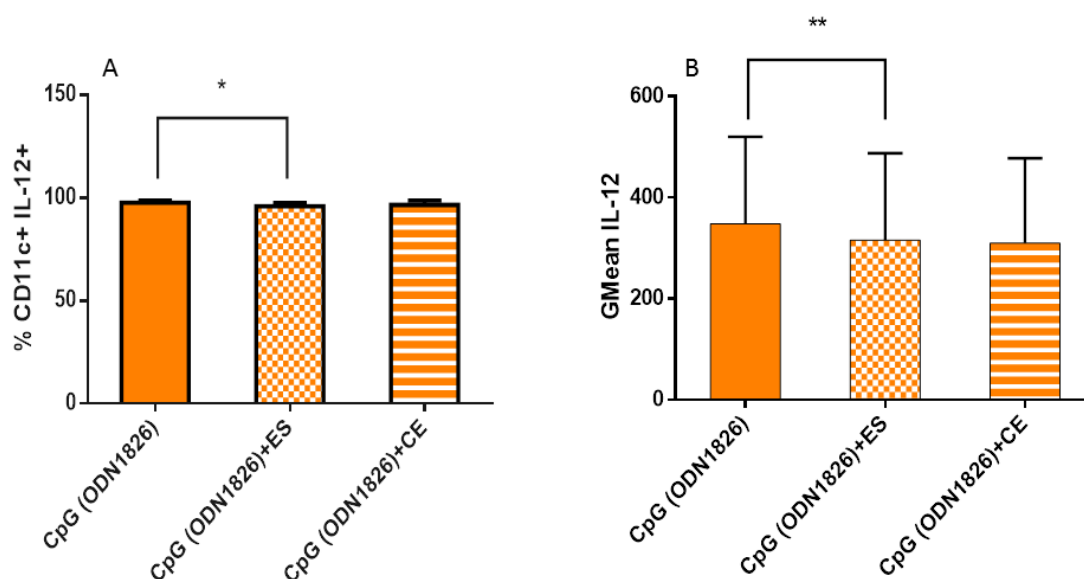


Figura 29. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,021$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,007$).

En segundo lugar, se estudiaron las poblaciones CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ tras 24 h de estimulación. ES y CE no dieron lugar a cambios en la población CD11c+ IL-10+

respecto al control, mientras que la asociación de CE con CpG (ODN1826) la aumentó levemente. La población CD11c⁺ IL-12⁺ sufrió un aumento en todos los casos estudiados respecto a los correspondientes controles, siendo estadísticamente significativo en el caso de ES ($p=0,013$) (Figura 30).

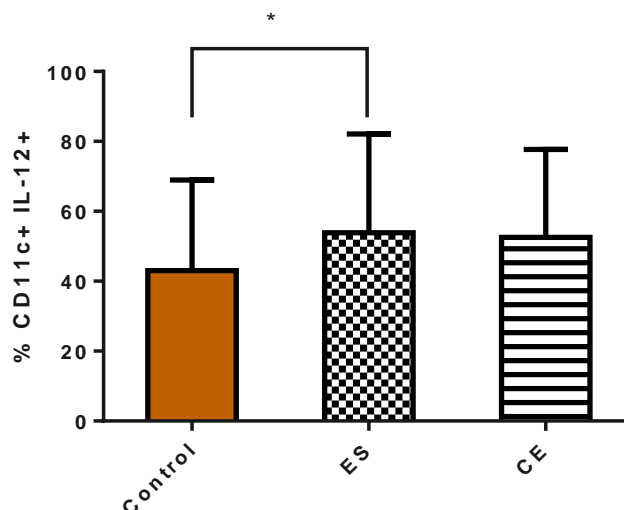


Figura 30. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺ IL-12⁺, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,013$).

Por último, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c⁻ IL-10⁺ y CD11c⁻ IL-12⁺. En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos.

Se analizaron las poblaciones CD11c⁻ IL-10⁺ y CD11c⁻ IL-12⁺, al igual que para la población CD11c⁺, tras 12 y 24 horas post-estimulación antigénica.

Tras 12 horas de estimulación, la adición de ES y CE en solitario originó un aumento en la población CD11c⁻ IL-12⁺ y un descenso en la CD11c⁻ IL-10⁺, que en ningún caso fueron estadísticamente significativos.

Al combinar ES y CE con CpG (ODN1826), la expresión de ambas citocinas se vio disminuida respecto al control positivo CpG (ODN1826) solo, con la única excepción de CpG (ODN1826) junto con ES que provocó un incremento en la expresión de IL-10.

Del mismo modo, la combinación tanto de ES como de CE con LPS *E. coli* 026B6 dio lugar a un descenso en concreto de las células CD11c⁻ IL-12⁺, así como de la propia expresión de la IL-12 en dicha población. La disminución en la expresión intracelular de la IL-12 fue estadísticamente significativo en el caso de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,049$) (Figura 31).

Tabla 15. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) 12 h | IL-10 (%) 24 h | IL-10 (Gmean) 12 h | IL-10 (Gmean) 24 h | IL-12 (%) 12 h | IL-12 (%) 24 h | IL-12 (GMean) 12 h | IL-12 (GMean) 24 h |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | 1,42±0,92 | 1,0±1,0 | 71,6±59,5 | 32,2±17,4 | 0,73±0,39 | 8,1±8,4 | 47,6±5,7 | 19,7±5,6 |
| ES | 1,23±1,01 | 1,3±1,2 | 96,6±98,2 | 39,2±32 | 0,87±0,57 | 14,9±12,1 | 49,4±7,6 | 22,5±8,2 |
| CE | 1,29±1,17 | 0,9±0,9 | 85,4±86,5 | 28,2±17,2 | 0,78±0,34 | 11±7,6 | 51,8±7 | 22,9±8,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 1,90±0,86 | 1,8±1,4 | 50,6±10,5 | 27,6±9,5 | 20,28±9,96 | 16,8±13,6 | 91,1±2,8 | 22,1±4,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 1,80±0,27 | 1,6±1,4 | 49±6,6 | 39,2±32 | 17,01±7,96 | 16,2±11,2 | 80,8±2 | 23,4±7,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 1,71±0,85 | 1,6±1,6 | 57±12,2 | 28,2±17,2 | 16,24±6,99 | 14,7±11,3 | 82,6±4,3 | 23,1±7,2 |
| CpG (ODN182 6) | 2,86±0,45 | 1,7±1,3 | 59,3±9,3 | 26,6±7,9 | 63,73±2,58 | 19,5±12,7 | 238,3±54 | 23,9±5,6 |
| CpG (ODN182 6) +ES | 3,28±1,11 | 1,1±0,8 | 50,3±11,3 | 28,8±10,3 | 60,33±9,00 | 22,1±12,5 | 198,5±73,9 | 24,7±5,8 |
| CpG (ODN182 6) +CE | 2,91±1,78 | 1,9±1,1 | 36,9±11,9 | 24,1±6 | 62,92±1,01 | 25,3±14,8 | 197,6±71,8 | 25,1±6,7 |

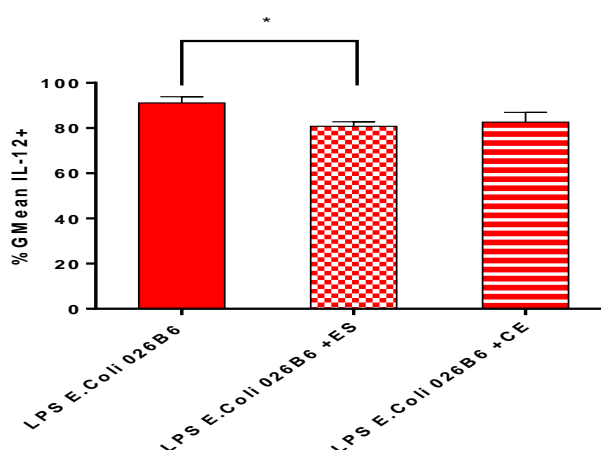


Figura 31. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,049$).

A las 24 horas post-estimulación, las células CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ se vieron incrementadas respecto al control en presencia de CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6 en solitario. Tanto en presencia de ES como CE, la población CD11c- IL-12+ se vio aumentada respecto al control negativo sin estimular, siendo dicho incremento estadísticamente significativo para ES ($p=0,014$). Así mismo, la expresión de IL-12 en la población CD11c- se vio incrementada por ES y CE en solitario, siendo en ambos casos estadísticamente significativo ($p=0,01$ y $p=0,01$, respectivamente) (Figura 32).

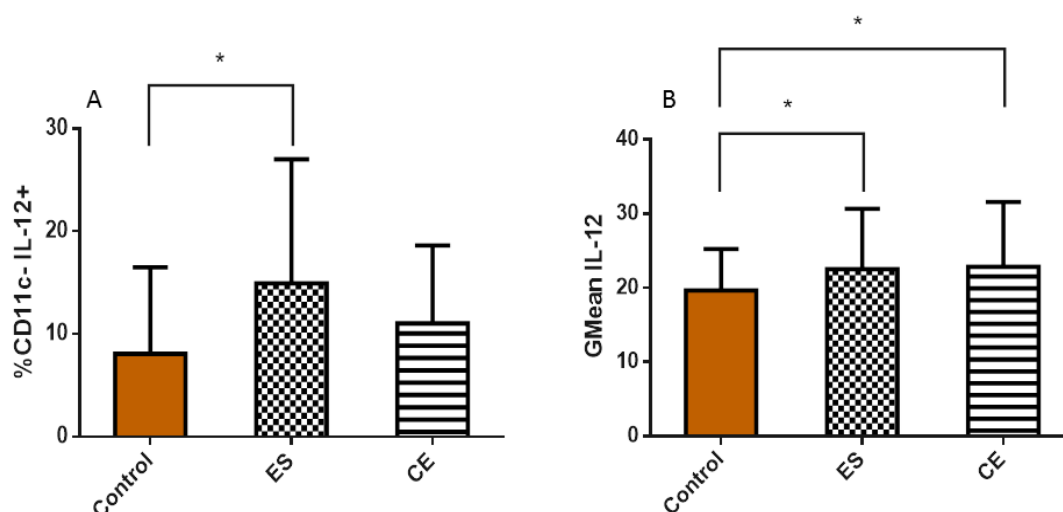


Figura 32. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,014$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la citocina IL-12 en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE respecto al control ($p=0,01$ y $p=0,01$, respectivamente).

Por otro lado, la población CD11c- IL-10+ solo fue aumentada por ES, mientras que fue disminuida por CE respecto al control negativo. La combinación de ambos controles positivos con ES o CE originó en todos los casos un descenso de ambas poblaciones (CD11c- IL-10+, CD11c- IL-12+), al compararlos con los valores obtenidos con ambos agonistas de los TLR.

Solo en el caso de CpG (ODN1826) con CE se originó un aumento de la población CD11c- IL-12+, que fue estadísticamente significativo respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,032$) (Figura 33).

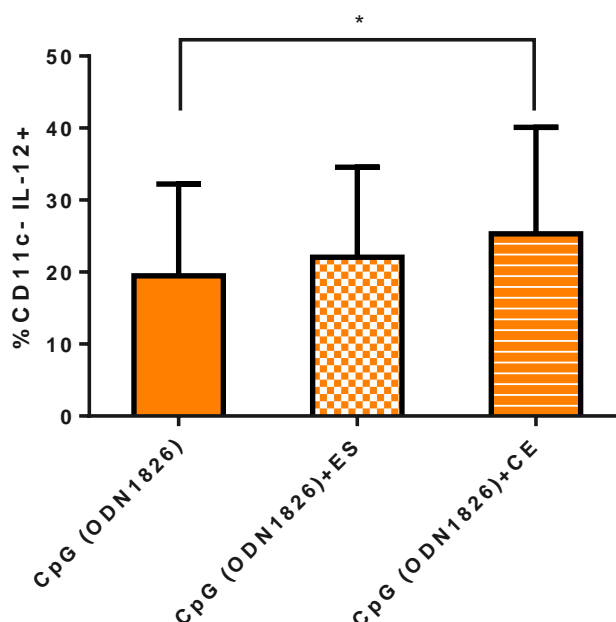


Figura 33. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,032$).

1.2. Efecto sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón procedentes de la cepa BALB/c a día 9 de maduración

Se analizaron los efectos producidos por los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre las células BMDDCs tras 24 horas post-estimulación a día 9 de maduración, en presencia de GM-CSF, bajo las condiciones descritas anteriormente en la sección “Estimulación y caracterización de células murinas” del Capítulo Materiales y Métodos.

1.2.1. Estudio de los cambios producidos en las poblaciones de células CD11c+ y CD11c-

En primer lugar, se analizó respecto al control negativo sin estimular, el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre el desarrollo y diferenciación de las BMDDCs a células CD11c+, así como respecto a los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826), a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. La Tabla 16 recoge los datos obtenidos.

Por tanto, se analizó respecto al control sin estimular, el porcentaje de las poblaciones CD11c+ y CD11c- en presencia de ES o CE, acompañando a LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto a estos mismos en solitario. De forma similar a los resultados obtenidos a día 6 de maduración, a día 9 se observó un aumento de la población CD11c+ en presencia de CE o ES solos respecto al control. Además, la asociación tanto

de ES como de CE con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) incrementó dicha población respecto a ambos controles positivos en solitario. Las diferencias observadas en ningún caso fueron estadísticamente significativas.

Tabla 16. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), y su desviación estándar, de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones a día 9 de maduración. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ (%) | CD11c+ (GMean) |
|-----------------------------|------------|----------------|
| Control | 57±29,9 | 40,4±15,9 |
| ES | 59,3±26 | 41±14,4 |
| CE | 71,1±4 | 35,7±16,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 55±28,3 | 46,9±6,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 57,8±25,4 | 48,1±6,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 65,5±12,8 | 44,8±10,9 |
| CpG (ODN1826) | 62,4±24,1 | 48,3±7,1 |
| CpG (ODN1826) +ES | 65,1±21,3 | 52±7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 74,5±1,5 | 48,1±10,3 |

En cuanto a los niveles de expresión de la molécula CD11c en esta población, se vio disminuida en presencia de solo CE, mientras que ES no dio lugar a cambio alguno respecto al control sin estimular. La asociación de ES, tanto con LPS *E. coli* 026B6 como con CpG (ODN1826), originó un incremento en la expresión de CD11c respecto a ambos controles positivos en solitario, siendo estadísticamente significativo en el caso de ES junto con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) individualmente ($p=0,039$) (Figura 34).

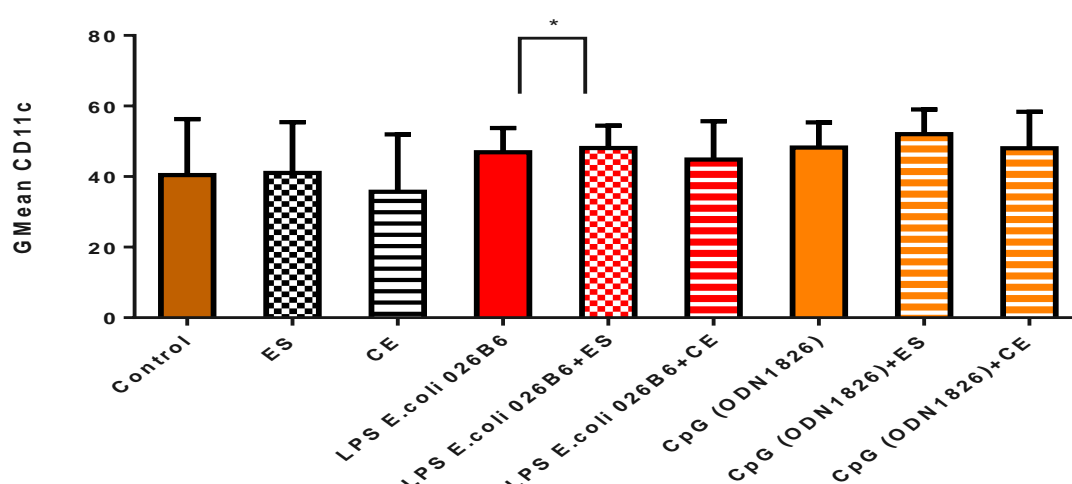


Figura 34. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,039$).

Por el contrario, la asociación de CE tanto con *E. coli* 026B6 como con CpG (ODN1826) dio lugar al efecto contrario: una disminución en la expresión de CD11c respecto a ambos controles positivos en solitario. No se determinaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

1.2.2. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86

Se analizaron las poblaciones CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 17. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (Gmean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|--------------|------------------|--------------|
| Control | 33,6±10,3 | 38,2±2,2 | 35,8±4,4 | 34,3±1,8 |
| ES | 40,3±10,4 | 38,9±2,3 | 48,4±10,3 | 35,6±4 |
| CE | 62,8±26,6 | 47,5±12,6 | 62,1±30,5 | 47,1±15 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 57,1±26,8 | 55,9±16,2 | 59,8±22,5 | 50,3±18,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 70,4±21,2 | 59,5±15,6 | 67±22,1 | 52,3±13,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 73±24,8 | 60,8±17,7 | 76,6±21,2 | 55,6±17,7 |
| CpG (ODN1826) | 73,7±17,7 | 83,5±23,6 | 77,4±11,6 | 75,1±22,7 |
| CpG (ODN1826)+ES | 83,4±7,4 | 82,9±9,6 | 82,1±6,5 | 74,9±18,3 |
| CpG (ODN1826)+CE | 85,4±7,7 | 82,8±10,1 | 86±7,8 | 141,8±160,2 |

De forma generalizada, las poblaciones CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+, así como la propia expresión de las moléculas CD80 y CD86 en dichas poblaciones, se vieron incrementadas en presencia de ambos antígenos empleados, respecto a los controles correspondientes en cada caso (control negativo, y controles positivos, LPS *E. coli* 026B6, CpG (ODN1826)). El incremento de la población CD11c+ CD86+ fue estadísticamente significativo para ES respecto al control sin estimular ($p=0,006$). Además, el incremento en la expresión de CD86 en la población CD11c+ fue cercano a la significancia para CE respecto al control ($p=0,05$) (Figura 35).

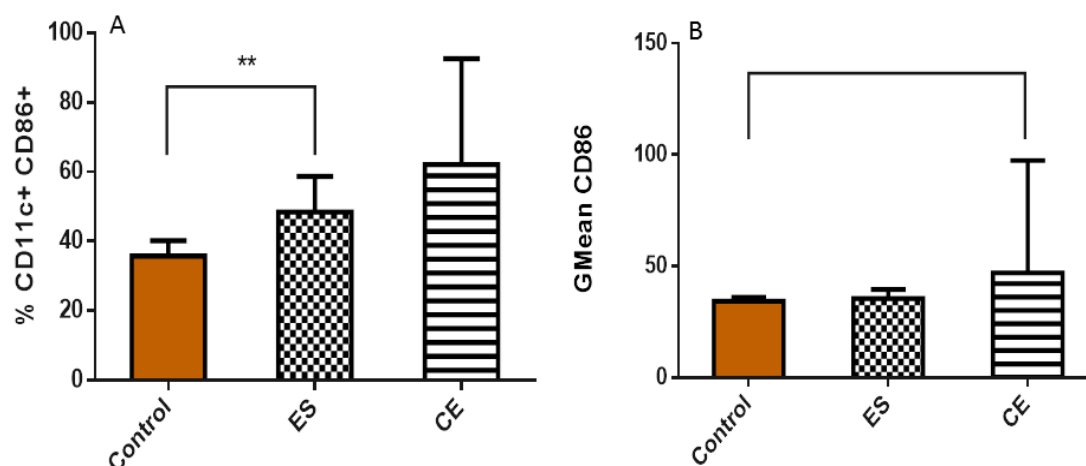


Figura 35. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD86+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,006$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue cercano a la significancia en presencia de CE respecto al control ($p=0,05$).

En cuanto a las poblaciones de células que no expresaron CD11c, es decir, CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | CD80 (%) | CD80 (Gmean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| Control | 19,2±30,7 | 42,2±20,3 | 5,4±4,1 | 45,3±7,2 |
| ES | 15,6±25,7 | 42,5±16,1 | 4,9±3,5 | 42,7±6,1 |
| CE | 20,6±24,5 | 41,8±19,4 | 8,7±7,6 | 46,7±4,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 27±27,4 | 47,8±20,3 | 17±14,3 | 58±19,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 21,5±16,2 | 48,1±18,4 | 15,4±11,2 | 56,8±18 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 26,5±23,4 | 45,7±21,3 | 12,6±7,9 | 49,2±4,1 |
| CpG (ODN1826) | 27,5±26,7 | 60,6±35,6 | 11,5±9 | 71±27 |
| CpG (ODN1826)+ES | 23,3±25,9 | 49,5±21,1 | 8,4±1,9 | 69,6±29 |
| CpG (ODN1826)+CE | 23,7±26,0 | 49,3±20,3 | 11,6±7,4 | 88±56,7 |

Ambas poblaciones se vieron incrementadas por los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto al control sin estimular, en especial CD11c- CD86+. Sin embargo, la estimulación con ES y CE en solitario, en general, apenas la modificó respecto al control negativo, o bien presentó una tendencia descendente.

Por último, al combinar ES y CE con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826), las poblaciones CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ se vieron disminuidas frente a los controles positivos respectivos en solitario, si bien en ningún caso este descenso fue estadísticamente significativo.

1.2.3. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHC II

En primer lugar, se estudiaron las poblaciones de células CD11c+: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+, a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 19. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como sudesviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (Gmean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|-----------|---------------|------------|-------------------|
| Control | 11,6±15 | 80,9±52,4 | 89,7±4,7 | 447,8±65,8 |
| ES | 14,9±17,4 | 135,6±201,6 | 90,6±5,1 | 475±120,4 |
| CE | 12,2±7,8 | 51,2±8,9 | 93,5±2,7 | 603±216,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 7,2±5,8 | 148,4±197,6 | 87,7±6,3 | 504,7±267,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 9,2±6,5 | 62,4±21,8 | 90,5±6 | 620,5±184,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 10,8±11,7 | 52,2±11,6 | 93,1±3 | 650,5±203,1 |
| CpG (ODN1826) | 7,9±5,9 | 243,5±386,4 | 90,5±3,8 | 606,5±200,9 |
| CpG (ODN1826) +ES | 20,0±31,3 | 126±84,3 | 92,4±3,8 | 671,3±204,7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 22,0±22,4 | 49,1±17,1 | 94,1±2,3 | 780,5±90,8 |

De forma general, ambas poblaciones apenas se vieron incrementadas por la presencia de ES y CE respecto al control. Asimismo, su combinación con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) también dio lugar a un incremento de dichas poblaciones respecto a LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) individualmente.

En el caso concreto de la población CD11c+ MHC II+, el aumento en la expresión de la molécula MHC II fue estadísticamente significativo al asociar CE con CpG (ODN1826) respecto a este último en solitario ($p=0,001$) (Figura 36).

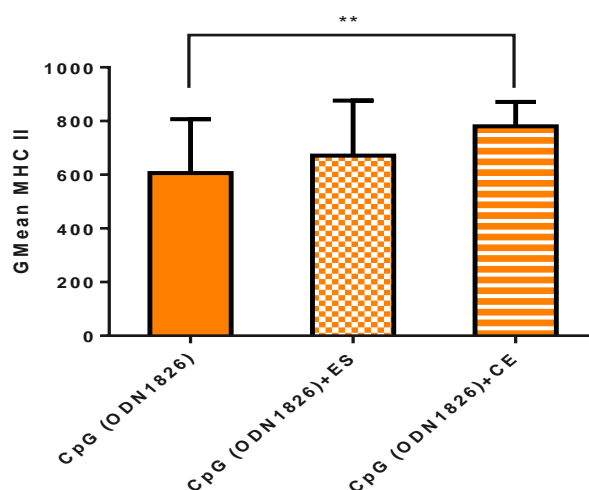


Figura 36. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,001$).

En segundo lugar, se analizaron los resultados obtenidos para las células que no expresaron CD11c (Tabla 20).

Las poblaciones CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ apenas se vieron modificadas por LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto al control sin estimular, a excepción de CD11c- MHC I+ que se vio disminuida ligeramente.

Por su parte, la estimulación con ES y CE en solitario, presentó una tendencia general en la reducción de ambas poblaciones, siendo dicho descenso estadísticamente significativo en el caso de ES, tanto para CD11c- MHC I como CD11c- MHC II+ ($p=0,034$ y $p=0,034$, respectivamente). Igualmente, la expresión de MHC II en la población CD11c- MHC II+ disminuyó en presencia de ES respecto al control sin estimular y fue cercano a la significancia ($p=0,05$) (Figura 37).

Por último, la combinación de LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) con ES y CE originó un descenso en las poblaciones estudiadas, CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+, respecto a los controles positivos en solitario, en ningún caso estadísticamente significativos.

Tabla 20. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (Gmean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|----------------|---------------|------------------|----------------|
| Control | 1±1,3 | 117,4±113,2 | 35,7±24,1 | 342,8±57,9 |
| ES | 0,8±1,3 | 118,8±94,6 | 30,4±20,8 | 305,4±33,2 |
| CE | 0,5±0,4 | 60,9±38,5 | 26,4±7,8 | 413±107,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 0,6±0,9 | 145,4±224,9 | 37±23,7 | 385,6±104,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 1,1±2,5 | 84,2±83,6 | 37±22,2 | 463,5±96,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 0,4±0,6 | 102,1±72,8 | 26,5±8,2 | 417,8±82,2 |
| CpG (ODN1826) | 0,3±0,3 | 116,3±137,7 | 31,3±21,9 | 350,8±29,1 |
| CpG (ODN1826) +ES | 1,5±2,8 | 201,8±206,9 | 28,6±19,4 | 367,4±37,0 |
| CpG (ODN1826) +CE | 1±2,0 | 100,9±70,7 | 22,8±4,2 | 364,1±40,1 |

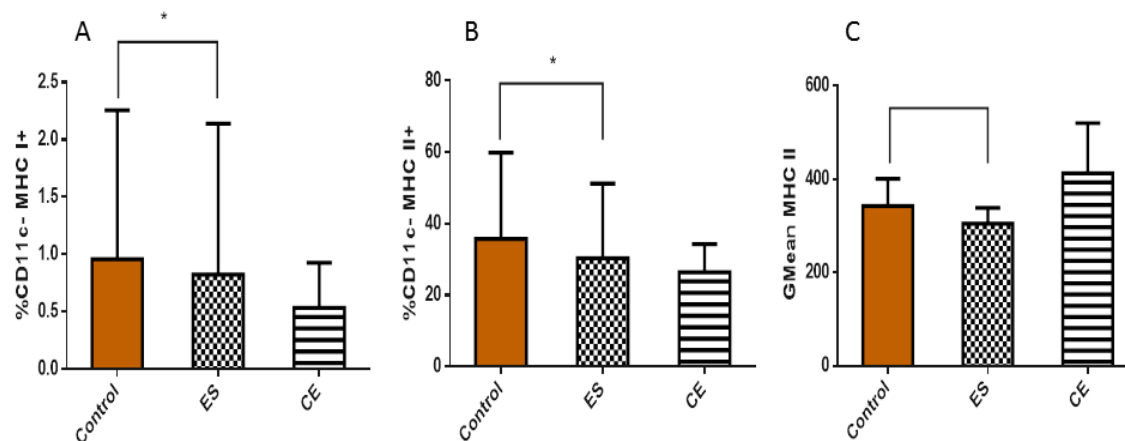


Figura 37. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$). **C.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c-, así como su desviación estándar. La reducción en la expresión de dicha molécula fue cercana a la significancia en presencia de ES respecto al control ($p=0,05$).

1.2.4. Estudio de los cambios producidos en la expresión intracelular de las citocinas IL-10 e IL-12 (24 horas)

Se estudiaron las poblaciones CD11c⁺ IL-10⁺ y CD11c⁺ IL-12⁺ tras su tratamiento con los diferentes estímulos a día 9 de maduración y durante 24 horas. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 21.

Tabla 21. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c⁺ IL-10⁺ y CD11c⁺ IL-12⁺ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) | IL-10 (Gmean) | IL-12 (%) | IL-12 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| Control | 29,9±7,2 | 47,9±15,3 | 72,7±4,5 | 47,1±0,9 |
| ES | 32±3,7 | 40,4±1,8 | 77,7±10,5 | 53,3±1,7 |
| CE | 26,3±1,7 | 39,2±0,5 | 80,7±1,6 | 44,7±2,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 29,9±5,6 | 45,2±5,6 | 75,1±4,3 | 46,7±1,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 48,9±30,1 | 49,7±11,3 | 77,7±10,5 | 49,4±4,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 30±5,8 | 40,6±1,0 | 80,7±1,6 | 50±2,5 |
| CpG (ODN1826) | 51,4±21,9 | 46,7±6,4 | 87,4±3,8 | 56,1±6,9 |
| CpG (ODN1826) +ES | 45±19,8 | 47,2±3,4 | 90,6±4,9 | 70±14,3 |
| CpG (ODN1826) +CE | 25,7±0,9 | 39,7±1,3 | 87,6±1,6 | 72±7,2 |

La población CD11c⁺ IL-10⁺ se vio potenciada por la estimulación en solitario de ES, mientras que la estimulación con CE la redujo respecto al control. Así mismo, la asociación de ES con LPS *E. coli* 026B6 incrementó dicha población respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario. Por el contrario, la combinación tanto de ES como de CE con CpG (ODN1826) disminuyó la población CD11c⁺ IL-10⁺ respecto a CpG (ODN1826) individualmente. En ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la población CD11c⁺ IL-12⁺, tanto ES como CE originaron un incremento de esta respecto al control. Además, la combinación de ES y CE, tanto con LPS *E. coli* 026B6 como con CpG (ODN1826), incrementó dicha población respecto ambos controles positivos en solitario. Del mismo modo, la expresión intracelular de esta citocina se vio incrementada en esta población en todos los casos respecto a los correspondientes controles. Dicho aumento fue estadísticamente significativo al combinar CE con CpG (ODN1826) respecto a este último individualmente ($p=0,01$) (Figura 38).

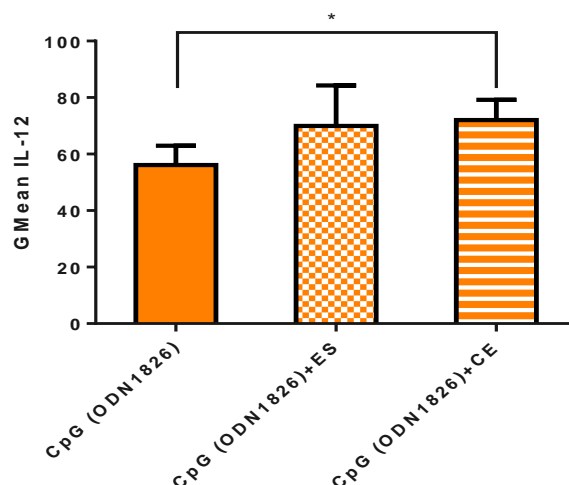


Figura 38. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la IL-12 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,01$).

Por otro lado, se estudiaron las poblaciones de células CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) | IL-10 (Gmean) | IL-12 (%) | IL-12 (GMean) |
|------------------------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| Control | 3,7±3,1 | 33,7±15,2 | 28,5±3,2 | 29±1 |
| ES | 4,4±0,9 | 25,5±0,8 | 34,70,3 | 31±1 |
| CE | 2,2±0,6 | 24,8±2,6 | 26,92,0 | 28,2±0,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 3,7±2,3 | 24,8±2,5 | 29,10,8 | 29,6±0,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 6,4±5,3 | 22,6±1,2 | 27,85,0 | 29,5±1,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 2,4±0,3 | 24,3±3,7 | 34,90,3 | 29,1±0,3 |
| CpG (ODN1826) | 9,6±2,7 | 24,2±3,5 | 41,84,7 | 35,9±1,9 |
| CpG (ODN1826) +ES | 6,6±6,4 | 30,8±2,5 | 43,68,3 | 40,1±2,0 |
| CpG (ODN1826) +CE | 2,8±0,5 | 25,2±1,6 | 48,20,8 | 40,6±1,3 |

La estimulación solo con ES presentó un incremento tanto de CD11c- IL-10+ como de la CD11c- IL-12+, aumento que fue estadísticamente significativo en ambos casos respecto al control ($p=0,034$ y $p=0,034$, respectivamente) (Figura 39).

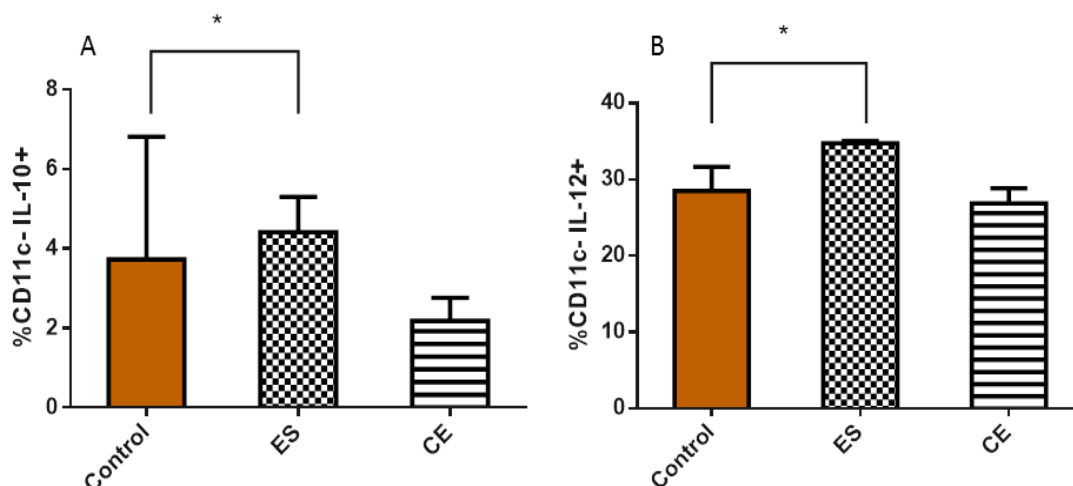


Figura 39. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-10+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$).

Por el contrario, la estimulación con CE dio lugar a un descenso en la población CD11c- IL-10 respecto al control, mientras que la población CD11c- IL-12+ no mostró apenas diferencias respecto al control.

En último lugar, la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) originó un descenso en la población CD11c- IL-10+, a excepción de LPS *E. coli* 026B6 +ES que fue considerablemente superior a LPS *E. coli* 026B6 en solitario, si bien en ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas. En contraposición, la población CD11c- IL-12+ experimentó un aumento generalizado en todos los casos respecto a los correspondientes controles, en especial al estimular de forma simultánea CpG (ODN1826) junto con CE respecto a CpG (ODN1826) solo.

1.3. Efecto sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón en la cepa C57BL/6 a día 6 de maduración

Se analizaron los efectos producidos por los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre las células BMDDCs tras 24 horas post-estimulación a día 6 de maduración en presencia de GM-CSF bajo las condiciones descritas anteriormente en la sección de “Estimulación y caracterización de las células murinas” del capítulo Materiales y Métodos.

1.3.1 Estudio de los cambios producidos en la población de células CD11c+ y CD11c-

En primer lugar, se analizó el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre el desarrollo y diferenciación de las BMDDCs a células CD11c+ respecto al control, así como respecto a los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) a día 6 de

maduración tras 24 h de estimulación. En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 23. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones en ratones CD57BL6 a día 6 de maduración. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ (%) | CD11c (GMean) |
|------------------------------------|----------------|----------------|
| Control | 44,4±13,5 | 68,8±19,7 |
| ES | 42,7±12,6 | 55,8±12 |
| CE | 46,3±13,1 | 61,6±13,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 45,9±17,8 | 58,9±17,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 39,7±13,2 | 49,9±9,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 48±18,2 | 60,9±16,4 |
| CpG (ODN1826) | 45,6±22 | 62,4±13,8 |
| CpG (ODN1826) +ES | 40,8±19 | 52,6±7,2 |
| CpG (ODN1826) +CE | 48,2±16,7 | 59,8±10,1 |

Se determinó el aumento o disminución de la población CD11c+ en presencia de ES o CE respecto al control, o bien acompañados por LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto a estos en solitario. De forma general, se apreció un descenso de la población CD11c+ en presencia de ES respecto al control, así como al asociarlo con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto a estos individualmente. Por el contrario, CE mostró la tendencia contraria.

Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas para la población CD11c+, que presentó un descenso al combinar ES con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,043$) (Figura 40).

Así mismo, la expresión de la molécula CD11c se vio disminuida por la presencia de ES en solitario respecto al control sin estimular, y al combinarlo con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto a estos en solitario. Por su parte, CE mostró cierta tendencia en la inhibición de la expresión de CD11c respecto al control negativo y frente a los controles positivos en solitario. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control en el caso de ES en solitario ($p=0,039$) (Figura 41).

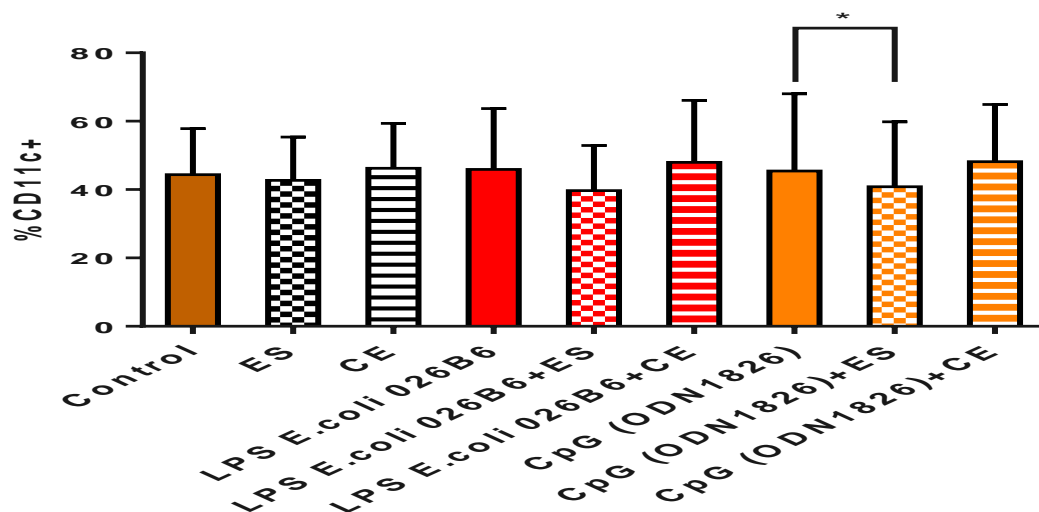


Figura 40. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+, así como su desviación estándar. La población CD11c+ se vio significativamente disminuida al asociar ES con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,043$).

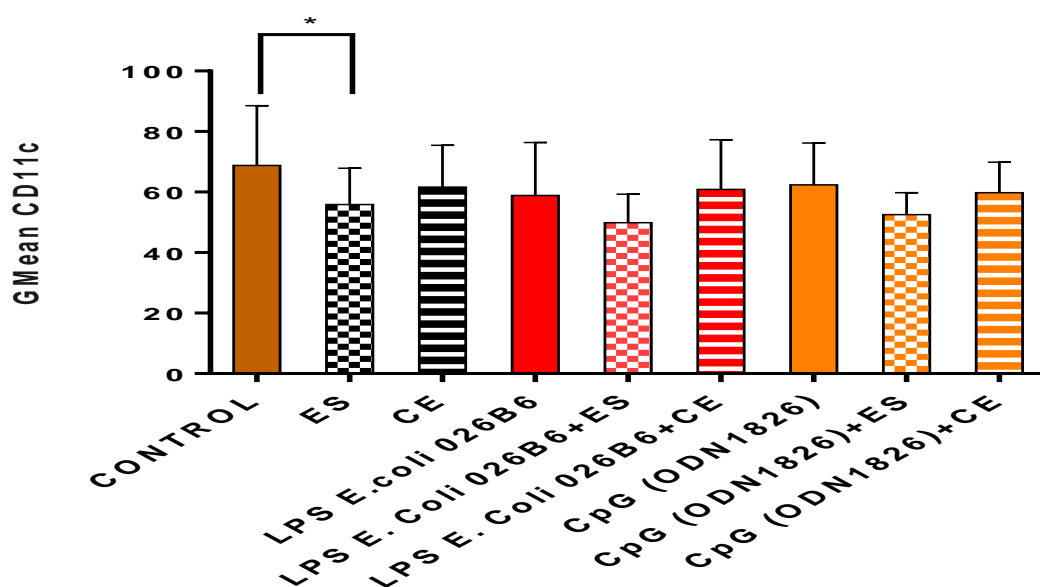


Figura 41. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c+, así como su desviación estándar. La expresión de CD11c se vio significativamente disminuida en presencia de ES respecto al control ($p=0,039$).

1.3.2. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86

En primer lugar, se analizaron las poblaciones CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en función de la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex*. En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación.

Tabla 24. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (Gmean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|----------------|------------------|------------------|--------------|
| Control | 50,1±25,6 | 57,2±18,2 | 43,1±18,5 | 50,8±12,2 |
| ES | 58±17,2 | 51,3±13,2 | 48,6±13,5 | 50,7±9,5 |
| CE | 55,1±20,5 | 53,8±17,9 | 38,1±18,2 | 51,9±12,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 78±12,7 | 72±16,4 | 64,8±24,9 | 64,5±16,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 71,7±18,2 | 71,3±29,7 | 71,6±6,8 | 62,1±15,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 75,3±19,2 | 67±18,5 | 66,8±20,7 | 59,6±14 |
| CpG (ODN1826) | 76,6±7,3 | 73,3±18,5 | 70,4±14,4 | 59,5±15,2 |
| CpG (ODN1826) +ES | 69,7±22 | 76,7±36,1 | 61,4±13,3 | 64,8±16,5 |
| CpG (ODN1826) +CE | 76,2±13,1 | 72,9±13,6 | 56,2±25,1 | 72,3±37,5 |

La estimulación tanto con ES como CE solos ocasionó un incremento en ambas poblaciones, CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+, respecto al control negativo. Solo en el caso de CE, la población CD11c+ CD86+ se vio disminuida respecto al control. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de ES en solitario respecto al control, que se recogen en las Figura 42 ($p=0,028$, $p=0,028$, respectivamente).

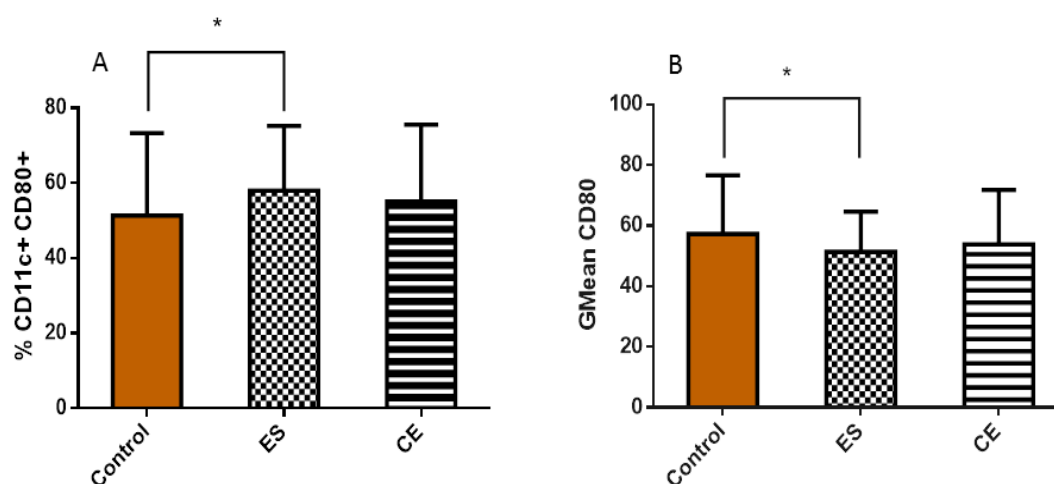


Figura 42. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,028$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80 en células CD11c+, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de ES respecto al control ($p=0,028$).

Por otra parte, la estimulación conjunta con LPS *E. coli* 026B6 y ES o CE, dio lugar a efectos contrarios: la población CD11c+ CD80+ se vio disminuida respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo,

mientras que la población CD11c+ CD86+ se vio incrementada. En ningún caso las diferencias determinadas fueron estadísticamente significativas.

Por último, la combinación de CpG (ODN1826) con ES o CE dio lugar al efecto inverso, una disminución en la población CD11c+ CD86+, mientras que la población CD11c+ CD80 apenas se vio modificada respecto a CpG (ODN1826) en solitario. El descenso de la población CD11c+ CD86+ fue estadísticamente significativo respecto a CpG (ODN1826) individualmente ($p=0,008$) (Figura 43).

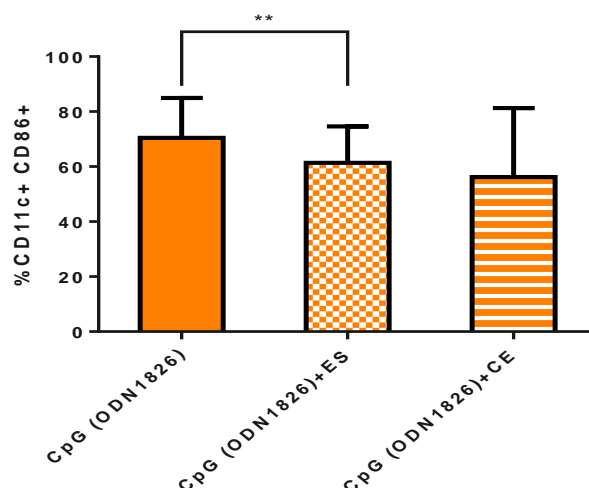


Figura 43. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD86+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,008$).

Así mismo se estudiaron las poblaciones CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en función de la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex*. En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación.

Tabla 25. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | CD80 (%) | CD80 (Gmean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| Control | 8,7±11,4 | 48,7±19,7 | 5,7±5,8 | 57,6±21,1 |
| ES | 4,5±1,1 | 47,9±17,4 | 6,4±5,6 | 69,6±7,4 |
| CE | 9,1±8,1 | 42,1±11,6 | 7,5±7 | 51,7±20,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 10,3±8,5 | 47,1±18,5 | 8,9±5,8 | 51,4±18,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 5,8±4,2 | 60,3±18,4 | 6,4±2 | 67,2±5,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 11,8±11,0 | 38,8±7,3 | 8,2±6,4 | 45,5±12,8 |
| CpG (ODN1826) | 9,3±5,3 | 52,7±28,8 | 5,9±5,1 | 52,1±17 |
| CpG (ODN1826) +ES | 6,6±4,2 | 65,2±38,9 | 5,7±0,9 | 71,7±6,4 |
| CpG (ODN1826) +CE | 12,9±8,6 | 43,2±9,9 | 9±7,4 | 52±24 |

De forma general, la presencia de ES, ya fuera en solitario o en combinación con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826), indujo la disminución de ambas poblaciones respecto a los controles correspondientes. Sin embargo, se observó el efecto contrario en el caso de CE. En ningún caso se determinaron diferencias estadísticamente significativas.

1.3.3. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHC II

Se analizaron las poblaciones CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en función de la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex* a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación. En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 26. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (Gmean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|
| Control | 23,8±20,4 | 63,1±44,3 | 71,2±20,7 | 217,2±109,7 |
| ES | 22,1±20,4 | 82,3±58,1 | 75,6±21,6 | 220±90,5 |
| CE | 30,3±23,4 | 65±41,9 | 70,5±22,7 | 221,1±136,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 42,2±25,1 | 69,1±43,9 | 82,6±13,9 | 342,4±260,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 33,2±25,1 | 80,8±52,6 | 87,3±10,7 | 479,1±339,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 41,9±27,7 | 77,8±73 | 85,0±12,4 | 365,4±283,2 |
| CpG (ODN1826) | 42,7±23,8 | 95,1±66,9 | 82,1±14,6 | 348,9±264 |
| CpG (ODN1826) +ES | 36,3±21,5 | 87,4±50,8 | 84,2±12,4 | 433,4±284,2 |
| CpG (ODN1826) +CE | 40,6±27,7 | 58,2±32,4 | 80,8±16,3 | 404,6±325,6 |

La estimulación con ES o CE originó una ligera tendencia hacia el aumento en la población CD11c+ MHC I, así como en la expresión de MHC I respecto al control, mientras que la población CD11c+ MHC II+ apenas se vio modificada.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 ocasionó un suave descenso en la población CD11c+ MHC I+ respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario, mientras que, tanto la población CD11c+ MHC II+, como la propia expresión de MHC II, se vio incrementada respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario. En ningún caso se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

La combinación de ES o CE con CpG (ODN1826) dio lugar a un descenso en ambas poblaciones, CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+, con la única excepción de la población CD11c+ MHC II que se vio incrementada al asociar ES con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826).

La disminución de la población CD11c+ MHC II+ en presencia de CE junto con CpG (ODN1826) fue estadísticamente significativa, respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,041$). Además, la menor expresión de la molécula MHC I en la población de células CD11c+ fue estadísticamente significativa al combinar CE y CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,04$) (Figura 44).

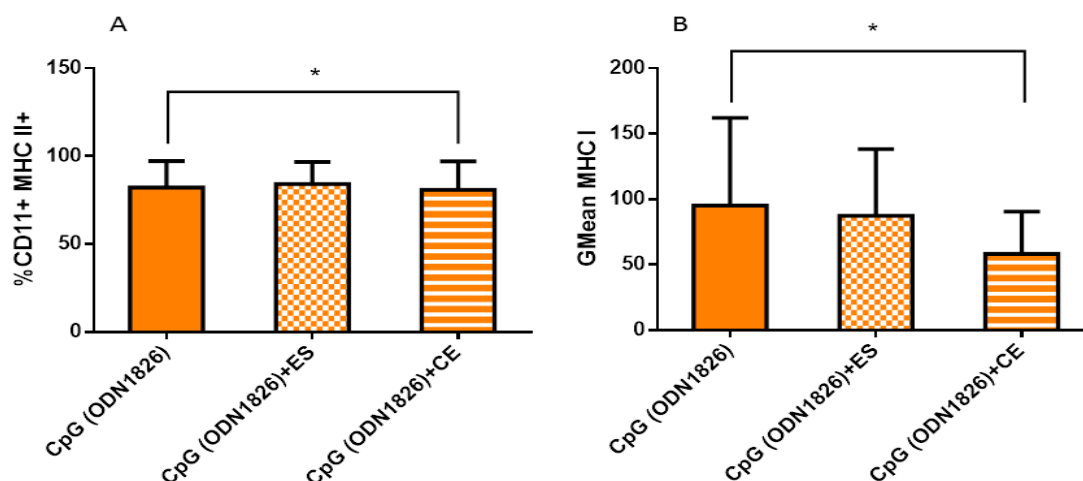


Figura 44. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC II+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,041$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de CE junto con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,04$).

Por otro lado, de forma paralela se estudiaron las células CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en función de la presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex* a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación. En la Tabla 27 se muestran los resultados obtenidos.

La presencia de ES o CE solos no supuso apenas modificaciones en ambas poblaciones estudiadas respecto al control, con la única excepción de la población CD11c- MHC I+ que, en presencia de CE, mostró una ligera tendencia hacia el incremento.

La combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) no dio lugar a grandes cambios en estas dos poblaciones respecto a ambos controles positivos en solitario. Solo la combinación de CpG (ODN1826) con CE supuso un descenso de la población CD11c- MHC I+ estadísticamente significativo respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,043$) (Figura 45). Curiosamente, la combinación de CpG+CE causó un aumento en la expresión de MHC I, aunque no fue estadísticamente significativo.

Tabla 27. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (Gmean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|----------------|---------------|------------|----------------|
| Control | 2,7±5,4 | 168,6±313,4 | 12,5±7,3 | 295±213,7 |
| ES | 1,4±1,8 | 244,3±375,4 | 12,6±8,6 | 348,9±208,1 |
| CE | 4±7,2 | 67,4±47,8 | 12±6 | 290,5±153,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 2,8±4,7 | 236,8±441 | 17,5±9,1 | 324,3±228,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 1,2±1,3 | 221,7±375 | 17,1±10,2 | 312,4±144,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 3,2±5,7 | 74,9±86 | 16,8±9,9 | 309,5±215,3 |
| CpG (ODN1826) | 2,6±3,4 | 153±228,8 | 16,9±9,3 | 342±251,7 |
| CpG (ODN1826) +ES | 1,4±0,9 | 213,7±296,1 | 15,1±9,7 | 359±206 |
| CpG (ODN1826) +CE | 3,7±7,1 | 51,3±26,2 | 14,4±8,2 | 314,9±218,5 |

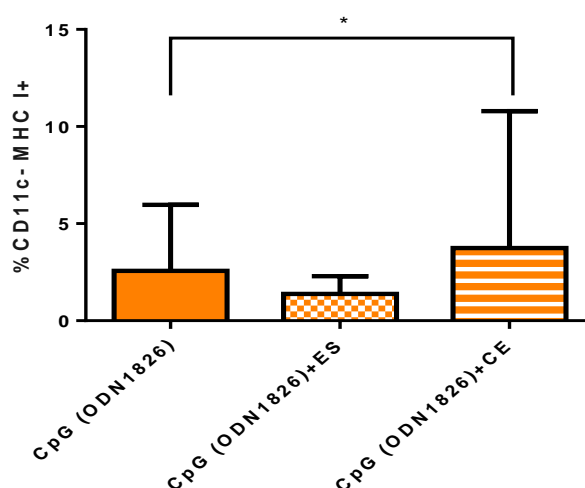


Figura 45. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,043$).

1.3.4. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las citocinas IL-10 e IL-12

La expresión intracelular de citocinas se determinó a las 12 h y 24 h tras la estimulación. Así, se determinaron a ambos tiempos el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+, así como el nivel de expresión intracelular de dichas citocinas en cada población. En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 28. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Además, la expresión de IL-10 y IL-12 en dichas poblaciones queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en negrita corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) 12 h | IL-10 (%) 24 h | IL-10 (Gmean) 12 h | IL-10 (Gmean) 24 h | IL-12 (%) 12 h | IL-12 (%) 24 h | IL-12 (GMean) 12 h | IL-12 (GMean) 24 h |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | 13,7±11,2 | 23,6±23 | 87,2±73,9 | 89,7±95,7 | 9±4 | 36,5±21,5 | 39,8±16,3 | 28,4±10,8 |
| ES | 18±19 | 32,4±21,9 | 99,3±95,1 | 28,1±6,8 | 9,6±6,6 | 43,1±24,1 | 40,3±14,3 | 25,4±9,6 |
| CE | 7,5±2,8 | 25,7±17,6 | 101,5±77,2 | 35,3±16,9 | 11,1±8 | 48,9±22,4 | 33,9±12,5 | 26,4±9,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 8±3,2 | 27,3±23,1 | 75,4±63,1 | 42,7±34,3 | 32,2±35,5 | 52,9±25,9 | 45,2±7,6 | 21,7±5,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 11,1±7,3 | 30,4±24 | 84,1±43,5 | 26,0±6,7 | 34,8±31,2 | 58,4±26,9 | 50,3±10,5 | 22,4±6,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 12±8,1 | 30,1±27,8 | 107,7±83,8 | 35,3±19,7 | 35,5±25,8 | 78,7±12,7 | 50,2±11,3 | 27±14,4 |
| CpG (ODN1826) | 7,4±3,5 | 38,1±29,9 | 78,3±63,9 | 38,9±29,8 | 82,9±17,8 | 76,9±19,2 | 89,4±29,7 | 26,6±10,7 |
| CpG (ODN1826)+ES | 7±3,6 | 30,8±16,6 | 79,9±54 | 23,2±4,8 | 82,8±16,8 | 77,8±20,3 | 102,5±26 | 23,1±5,1 |
| CpG (ODN1826)+CE | 6,9±4,1 | 32,6±22,3 | 88,2±77,1 | 34,1±21,6 | 79,3±20,5 | 84,3±15,2 | 90,8±25,6 | 28±8,4 |

Tras 12 h de estimulación, la presencia de ES originó un incremento tanto de la población CD11c+ IL-10+ como de la propia expresión intracelular de la IL-10 respecto al control, aunque en ningún caso fue estadísticamente significativo. En contraste CE presentó el efecto contrario, además de incrementar la población CD11c+ IL-12+.

Así mismo, la adición de ES o CE junto con LPS *E. coli* 026B6 supuso un incremento suave de ambas poblaciones y en la expresión de ambas citocinas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, que en ningún caso fue estadísticamente significativo. La combinación de ES o CE con CpG (ODN1826) no dio lugar a apenas cambios respecto a CpG (ODN1826) en solitario.

Sin embargo, tras 24 h de estimulación, el perfil encontrado fue diferente. La presencia de ES continuó promoviendo un aumento de la población CD11c+ IL-10+, pero al mismo tiempo, tanto ES como CE originaron un incremento de la población CD11c+ IL-12+ respecto al control sin estimular. Además, tanto ES como CE inhibieron la expresión intracelular de IL-10, siendo dicho descenso estadísticamente significativo en el caso de CE respecto al control ($p=0,026$) (Figura 46).

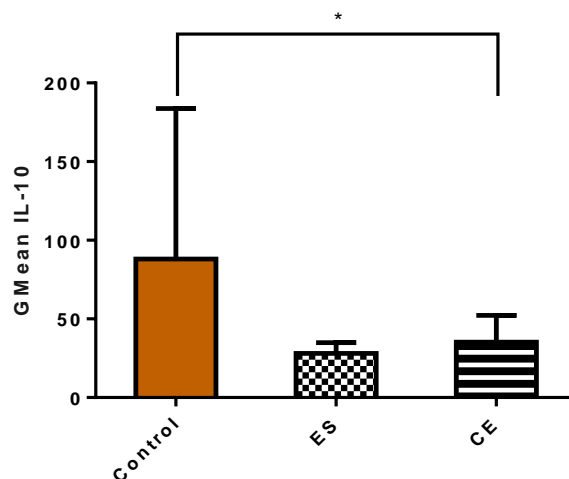


Figura 46. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la citocina IL-10 en células CD11c+, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de CE respecto a al control ($p=0,026$).

En general, tras 24 h de estimulación la respuesta fue más marcada que tras 12 h. La combinación ES o CE junto con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) ocasionó un aumento de la población CD11c+ IL-12+, siendo estadísticamente significativo para LPS *E. coli* 026B6 junto con CE respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,035$) (Figura 47).

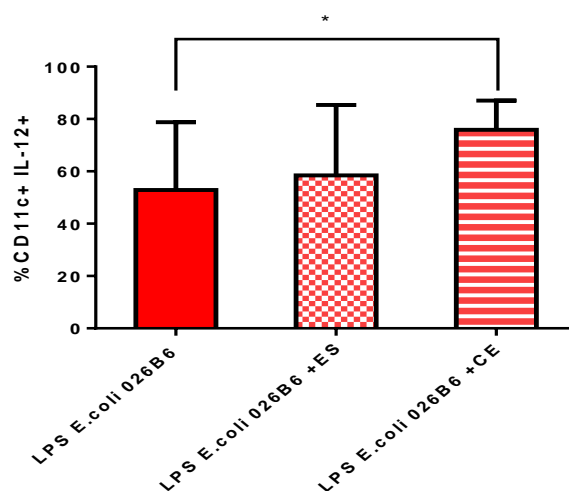


Figura 47. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,035$).

Al mismo tiempo, se observó un descenso en la población CD11c⁺ IL-10⁺ y en la expresión de IL-10 al asociar ES o CE junto con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, se analizaron los resultados obtenidos en las células que no expresaron CD11c: CD11c⁻ IL-10⁺ y CD11c⁻ IL-12⁺. Igual que en los casos anteriores, se realizaron todas las determinaciones tanto a las 12 como a las 24 h post-estimulación. En la Tabla 29 se recogen los resultados obtenidos.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c⁻ IL-10⁺ no presentó cambio alguno en presencia de ES, mientras que CE dio lugar a un suave incremento respecto al control negativo. Además, la combinación ES o CE tanto con LPS *E. coli* 026B6 como con CpG (ODN1826) causó un descenso en dicha población respecto a los controles positivos solos.

Por otro lado, la población CD11c⁻ IL-12⁺ se vio levemente incrementada por ES y CE solos respecto al control. Si bien, la acción conjunta de ES o CE junto con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) no originó grandes cambios respecto a ambos controles positivos solos.

Tabla 29. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c⁻ IL-10⁺ y CD11c⁻ IL-12⁺ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) 12 h | IL-10 (%) 24 h | IL-10 (Gmean) 12 h | IL-10 (Gmean) 24 h | IL-12 (%) 12 h | IL-12 (%) 24 h | IL-12 (GMean) 12 h | IL-12 (GMean) 24 h |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | 1,2±0,9 | 2,9±5 | 34,3±20,1 | 31,8±16 | 0,83±0,56 | 5,3±6,2 | 27,5±12,8 | 14,3±3,3 |
| ES | 1±1,4 | 1,7±2 | 53±47,9 | 22,2±12,3 | 1,01±0,71 | 5,6±5 | 25,6±7,4 | 14,3±2,8 |
| CE | 3,1±4,1 | 2,6±3,5 | 35,5±36,7 | 33,7±18,7 | 1,46±0,27 | 6,1±4,8 | 20,7±1,2 | 14,3±2,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 7,1±10 | 4,6±7,7 | 20,9±13,7 | 29,4±9,2 | 8,13±8,42 | 6,2±7,2 | 26,4±11,6 | 14,6±2,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 1,1±1,4 | 2,3±3,4 | 24,1±10,6 | 29,9±23,5 | 7,73±8,38 | 9,6±10,6 | 31,1±13,3 | 13,8±2,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 4,1±5,7 | 3,9±4,9 | 38,7±22,4 | 30±17,9 | 7,65±7,82 | 12,1±7,3 | 35,5±16,5 | 14,6±4,3 |
| CpG (ODN1826) | 4,5±7,4 | 4,6±5,5 | 49,7±40,9 | 25,2±8,4 | 24,02±19,2 | 12,8±6,5 | 48,2±22,6 | 16,2±2,8 |
| CpG (ODN1826)+ES | 0,7±0,5 | 2,8±3,8 | 31,6±19,3 | 34±19,8 | 21,53±17,9 | 18,7±16 | 47,6±19,4 | 15,4±1,4 |
| CpG (ODN1826)+CE | 0,6±0,2 | 2,9±3,9 | 42,2±23,3 | 24,6±9,7 | 22,30±19,6 7 | 16,2±5,7 | 43,9±21,8 | 15,5±2,1 |

Por último, tras 24 h de estimulación, la población CD11c- IL-10+ se vio disminuida tanto por ES y CE en solitario respecto al control, como al asociarlos a LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) respecto a ambos controles positivos solos. Por el contrario, la población CD11c- IL-12+ se vio incrementada al combinar ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) respecto a ambos controles positivos en solitario. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de LPS *E. coli* 026B6 con ES ($p=0,028$) y LPS *E. coli* 026B6 con CE ($p=0,047$) (Figura 48). ES y CE individualmente no ocasionaron cambio alguno en la población CD11c- IL-12+ respecto al control.

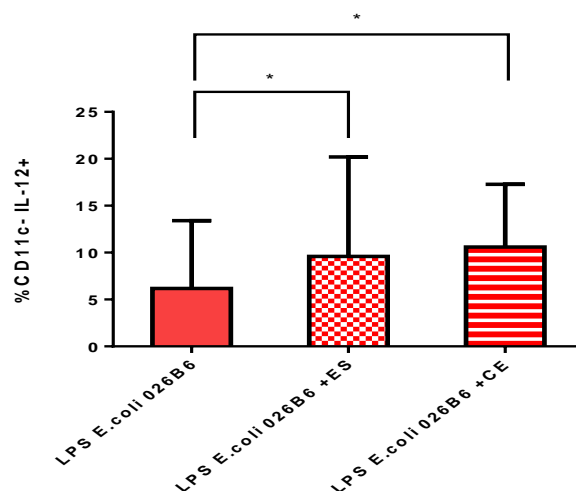


Figura 48. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,028$, $p=0,047$, respectivamente).

Si bien la combinación tanto de ES como CE con CpG (ODN1826) incrementaron la población CD11c- IL-12+ respecto a CpG (ODN1826) en solitario, también aumentaron la expresión intracelular de la IL-10, siendo estadísticamente significativo en el caso de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,026$) (Figura 49).

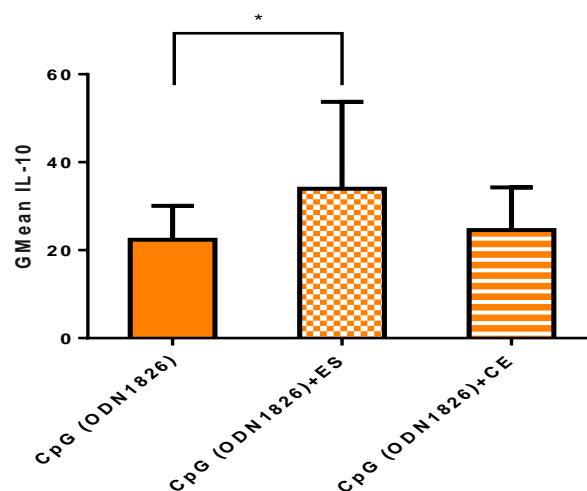


Figura 49. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la citocina IL-10 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,046$).

1.4. Efecto sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón de la cepa C57BL/6 a día 9 de maduración

1.4.1. Estudio de los cambios producidos en la población de células CD11c+ y CD11c-

En primer lugar, se analizó el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre el desarrollo y diferenciación de las BMDDCs a células CD11c+ respecto al control, así como respecto a los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. La Tabla 30 recoge los datos obtenidos.

Tabla 30. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones a día 9 de maduración. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c (%) | CD11c (GMean) |
|-----------------------------|-----------|---------------|
| Control | 54,5±13,1 | 56,2±12,2 |
| ES | 48,7±12,7 | 47,9±9,2 |
| CE | 49,4±10 | 46,7±11,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 58±13,1 | 50,5±6,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 51,1±13 | 46,1±6,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 49,9±7,6 | 45,2±6,6 |
| CpG (ODN1826) | 60,1±9,4 | 54±6,5 |
| CpG (ODN1826) +ES | 54,9±10,9 | 49,2±7,4 |
| CpG (ODN1826) +CE | 54,1±9,1 | 48,6±6,5 |

De forma general, la población CD11c⁺ se vio inhibida siempre en presencia de los antígenos larvarios de *A. simplex*. La estimulación con ES o CE dio lugar a un menor porcentaje de dicha población respecto al control. Y no solo eso, si no que la asociación de LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) tanto con ES como CE inhibió la población CD11c⁺, originando un menor porcentaje respecto a LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) en solitario

El descenso en la población CD11c⁺ fue estadísticamente significativo en tres casos: al asociar LPS *E. coli* 026B6 y ES respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,009$) y la combinación tanto de ES como CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,041$ y $p=0,012$, respectivamente) (Figura 50).

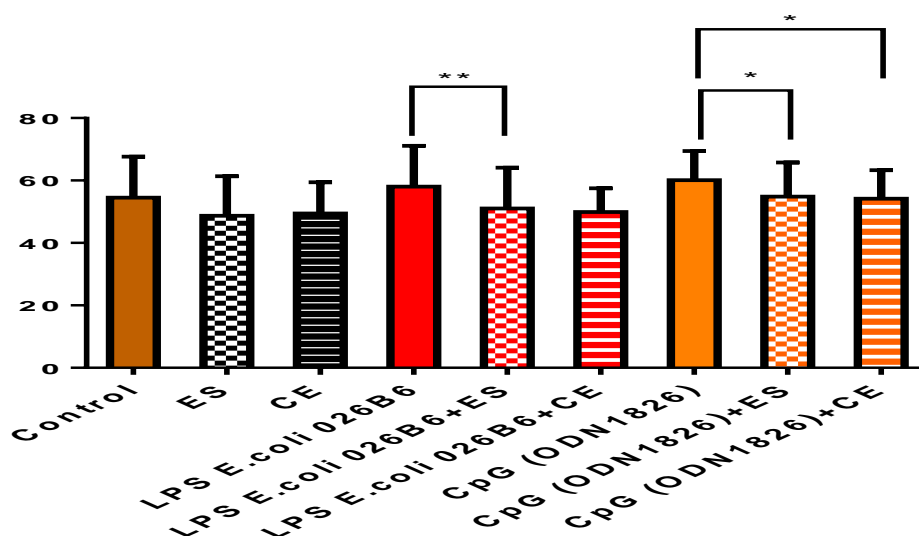


Figura 50. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺, así como su desviación estándar. El descenso en la población CD11c⁺ fue estadísticamente significativo en el caso de la asociación de ES con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,009$), así como al asociar tanto ES como CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,041$ y $p=0,012$, respectivamente).

De la misma manera, la Intensidad de Fluorescencia Media de la molécula CD11c, es decir, la expresión de CD11c se vio disminuida en presencia de ES y CE en todos los casos, ya estuvieran solos o en combinación con LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) respecto a los correspondientes controles.

Tal y como se puede ver en la Figura 51, dicho descenso fue estadísticamente significativo en casi todos los casos: ES y CE respecto al control ($p=0,008$ y $p=0,032$, respectivamente); ES y LPS *E. coli* 026B6 en combinación respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario ($p=0,045$), y tanto ES como CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,013$ y $p=0,039$, respectivamente).

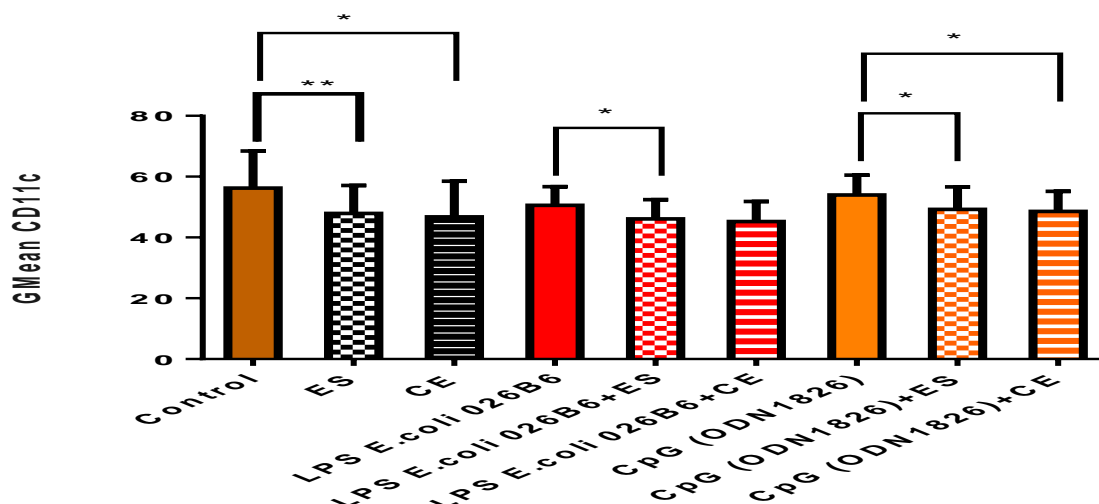


Figura 51. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de ES y CE frente al control ($p=0,008$ y $p=0,032$, respectivamente); así como al asociar ES con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,045$), y al combinar tanto ES como CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,013$ y $p=0,039$, respectivamente).

1.4.2. Estudio de los cambios producidos en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86

En primer lugar, se analizaron las poblaciones CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex*. En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación.

Tabla 31. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|-----------------------------|-----------|--------------|-----------|------------------|
| Control | 50,7±10,9 | 46±9,8 | 53,7±13,4 | 45,2±6,9 |
| ES | 56±14,9 | 47±7 | 53,4±11 | 46,3±7 |
| CE | 49,5±12,4 | 43,7±4,9 | 51,3±10,5 | 47,4±2,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 66,3±17,8 | 58,5±16,5 | 73,5±11,2 | 60,8±19,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 62,9±18,6 | 53,6±9,8 | 72,8±12,6 | 54,2±15,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 52,6±11,1 | 49,9±3 | 65,5±4,8 | 52,4±11,6 |
| CpG (ODN1826) | 63,2±13,1 | 57,6±7,9 | 64,7±10,3 | 56,2±12 |
| CpG (ODN1826) +ES | 60,6±13,6 | 55,9±8,9 | 64,8±15,2 | 55,8±15,6 |
| CpG (ODN1826) +CE | 50,3±13,8 | 58,1±3,9 | 63,2±4,1 | 55,9±19,4 |

Las poblaciones CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺ no se vieron modificadas por la presencia de ES ni CE respecto al control, a excepción de ES para CD11c⁺ CD80⁺, que ocasionó un incremento suave y muy inferior al originado por los controles positivos en solitario. Por otro lado, la asociación tanto de ES como de CE con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826), se observó un descenso de las poblaciones CD11c⁺ CD80⁺ y CD11c⁺ CD86⁺, respecto a los controles positivos solos. Dicha disminución fue cercana a la significancia para las células CD11c⁺ CD80⁺ al combinar LPS *E. coli* 026B6 con CE ($p=0,05$). Además, la expresión de la molécula CD86 se vio disminuida en presencia de CE junto con LPS *E. coli* 026B6, siendo estadísticamente significativa respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario ($p=0,046$) (Figura 52).

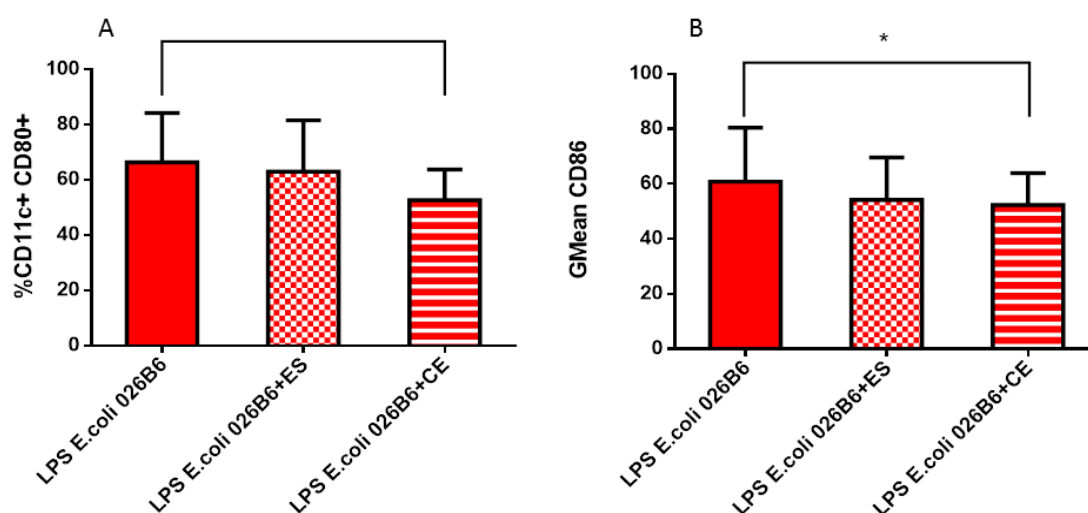


Figura 52. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺ CD80⁺, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue cercana a la significancia en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,05$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la molécula de superficie CD86 en células CD11c⁺, así como su desviación estándar. La menor expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de CE y LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,046$).

Por otro lado, se determinaron los valores obtenidos para la población de células que no expresaron la molécula de superficie CD11c⁻: CD11c⁻ CD80⁺ y CD11c⁻ CD86⁺. En la siguiente Tabla 32 se recogen todos los datos.

Las poblaciones CD11c⁻ CD80⁺ y CD11c⁻ CD86⁺ presentaron un aumento en presencia de ES o CE solos respecto al control, siendo estadísticamente significativo el incremento de la población CD11c⁻ CD80⁺ en presencia de ES solo respecto al control ($p=0,042$) (Figura 53).

La combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 no presentó apenas modificaciones en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, la combinación de ES con CpG (ODN1826) originó un incremento de la población CD11c⁻ CD86 respecto a solo CpG (ODN1826), que fue estadísticamente significativo ($p=0,04$) (Figura 54).

Tabla 32. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración, tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (Gmean) | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|------------------------------------|----------------|--------------|-----------------|--------------|
| Control | 3,9±2,2 | 43,5±4,8 | 5,9±1,9 | 42±4,9 |
| ES | 5,8±3,6 | 45,8±6,2 | 7±4,1 | 47,1±8,2 |
| CE | 4,6±2,4 | 43,8±3,7 | 8±4,9 | 46±6,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 4,2±3,2 | 47,1±3,5 | 8±5,2 | 46,2±7,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 4,1±2,1 | 46,9±9,7 | 8,7±4,1 | 44,9±7,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 3,7±2,1 | 43,6±3,9 | 7,4±4,2 | 44,8±9,2 |
| CpG (ODN1826) | 5,8±3 | 47,7±5,3 | 8,3±5,5 | 49,6±5,2 |
| CpG (ODN1826) +ES | 4,7±2,5 | 49,3±6,4 | 10,9±6,4 | 47,2±7,7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 6,8±3,3 | 53,5±8,1 | 7,6±5,7 | 49±6,3 |

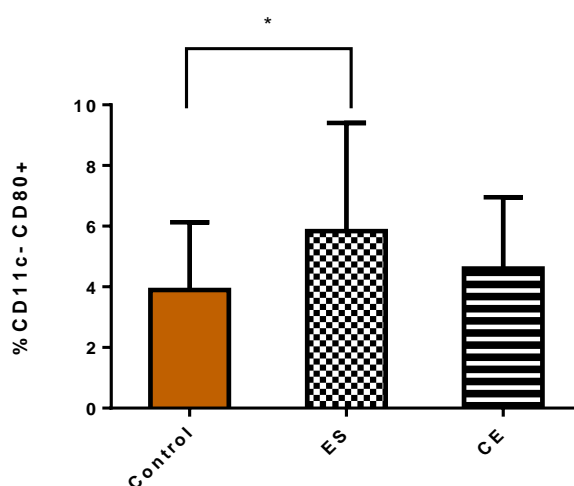


Figura 53. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- CD80+ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,042$).

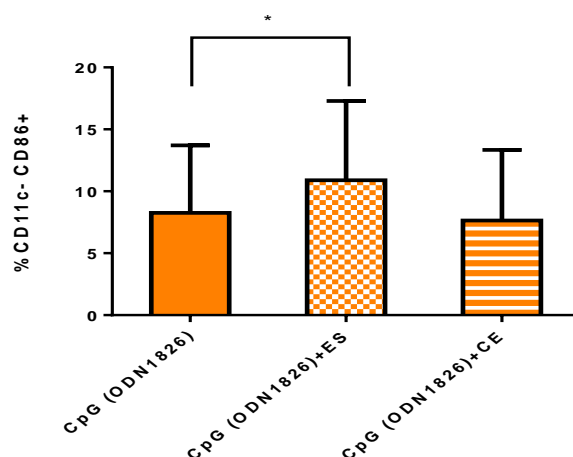


Figura 54. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- CD86+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,04$).

1.4.3. Estudio de los cambios producidos en las moléculas de superficie del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHC II

Se analizaron las poblaciones CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. En la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 33. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (Gmean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|------------------|---------------|------------|----------------|
| Control | 30±18 | 111,2±57,2 | 73,4±13,3 | 187,1±94,6 |
| ES | 25,1±15,7 | 95,3±30,5 | 70,5±16,1 | 185,4±114,1 |
| CE | 37,5±19,2 | 85,3±28 | 71,3±8,2 | 156,6±50,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 39,4±26,1 | 70,1±19,6 | 82,2±17,5 | 272,1±174,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 32,8±18,6 | 93,6±40,8 | 79,9±18,4 | 295,4±216 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 28,8±25,4 | 59,7±8,1 | 79,6±13,2 | 175,4±40,1 |
| CpG (ODN1826) | 24,4±15,5 | 144,8±133,9 | 83,4±14,6 | 257,9±147,6 |
| CpG (ODN1826)+ES | 17,6±13,5 | 74±25,1 | 80,7±18,4 | 258,3±178,2 |
| CpG (ODN1826)+CE | 39,4±29,2 | 234±298,3 | 87,5±5,6 | 204,5±41,4 |

La población CD11c+ MHC I+ se vio disminuida por ES y, por el contrario, aumentada por CE respecto al control, no hallándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos casos. Por su parte, la población CD11c+ MHC II+ no presentó apenas modificaciones en presencia de ES ni CE respecto al control.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) causó un descenso de ambas poblaciones respecto a ambos controles positivos en solitario. Solo en el caso concreto de la asociación de CE y CpG (ODN1826), tanto CD11c+ MHC I+ como CD11c+ MHC II+ se vieron incrementadas respecto al CpG (ODN1826) en solitario.

La disminución de la población CD11c+ MHC I+ fue estadísticamente significativa para LPS *E. coli* 026B6 junto con CE respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario ($p=0,014$) (Figura 55).

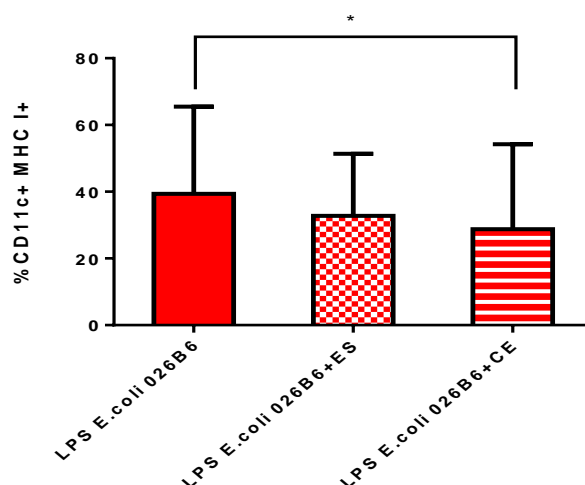


Figura 55. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de CE y LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,014$).

Además, se analizaron las poblaciones CD11c- MHC I y CD11c- MHC II+ a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 34.

Las poblaciones CD11c- MHC II+ y CD11c- MHC I+ no se vieron modificadas por la presencia de ES, mientras que CE incrementó las células CD11c- MHC I+ y disminuyó las CD11c- MHC II+ respecto al control.

Al asociar ES o CE con LPS *E. coli* 026B6, ambas poblaciones experimentaron un ligero aumento respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario, siendo estadísticamente significativo en el caso de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 para la población CD11c- MHC I+ ($p=0,049$) (Figura 56).

En último lugar, la combinación de CpG (ODN1826) con ES y CE no originó apenas cambios en las poblaciones estudiadas respecto a CpG (ODN1826) en solitario.

Tabla 34. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (Gmean) | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|------------------------------------|----------------|---------------|------------|----------------|
| Control | 3,8±4 | 193,3±219,2 | 20,1±12,6 | 316,9±155,5 |
| ES | 3,6±6,5 | 186,8±178,3 | 22,2±15,3 | 332,8±178,1 |
| CE | 6,5±5,6 | 115,7±121,9 | 18,2±9,2 | 228,6±42,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 1,7±1,7 | 216,4±322,1 | 23,8±16,4 | 247,1±195,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 2,9±3,2 | 226,6±276,9 | 34,3±19,4 | 236,3±166 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 2,9±3,5 | 81,1±57,4 | 20,6±9,5 | 156,6±57,2 |
| CpG (ODN1826) | 1,6±1,5 | 359±452,6 | 29,5±17,9 | 291,4±239,4 |
| CpG (ODN1826) +ES | 1,4±2,3 | 267,8±205,5 | 35,9±20,4 | 297,3±204,1 |
| CpG (ODN1826) +CE | 3,4±2,8 | 187,7±187 | 19,2±9,8 | 179,1±49,2 |

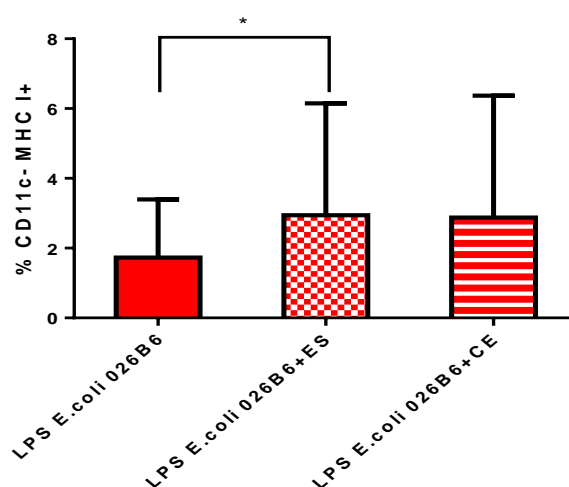


Figura 56. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,049$).

1.4.4. Estudio de los cambios producidos en la expresión intracelular de las citocinas IL-10 e IL-12

La expresión intracelular de citocinas en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración se determinó solo a las 24 h de estimulación. Así, se determinó el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+, así como el nivel de expresión intracelular de dichas citocinas. En la Tabla 35 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 35. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

| | IL-10 (%) 24 h | IL-10 (Gmean) 24 h | IL-12 (%) 24 h | IL-12 (GMean) 24 h |
|------------------------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Control | 12,1±6,6 | 24±7,3 | 28,4±20 | 18,3±0,4 |
| ES | 11,3±4,9 | 19,5±0,8 | 39,7±26,4 | 19±1,1 |
| CE | 21,3±21 | 19,9±2,2 | 53,6±36,4 | 20,5±4,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 12,4±4,3 | 19±1,2 | 35,4±20,4 | 17,1±0,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 18,8±12,6 | 18,7±1,3 | 43,7±27,6 | 18,1±0,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 17,4±12,8 | 19,2±0,6 | 44,6±11,2 | 18,7±1,6 |
| CpG (ODN1826) | 13,9±4,7 | 19,5±1,1 | 50,3±19,6 | 19,1±0,9 |
| CpG (ODN1826) +ES | 17,5±10,5 | 19,1±0,7 | 56,2±14,8 | 19,5±0,5 |
| CpG (ODN1826) +CE | 13,2±3,7 | 19,5±0,2 | 45,4±23,6 | 18,2±0,9 |

La estimulación con ES y CE solos incrementó las poblaciones CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+, si bien en ningún caso dicho aumento fue estadísticamente significativo.

La combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) causó un aumento de ambas poblaciones, así como de la expresión intracelular de ambas citocinas respecto a los controles positivos en solitario en todos los casos, con la única excepción de la asociación de CpG (ODN1826) con CE, que no dio lugar a cambio alguno.

Finalmente, se analizaron los datos obtenidos en relación a las poblaciones CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ a día 9 de maduración y tras 24 h de estimulación. Los resultados se recogen en la Tabla 36.

Tabla 36. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (%) 24 h | IL-10 (Gmean) 24 h | IL-12 (%) 24 h | IL-12 (GMean) 24 h |
|------------------------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Control | 0,212±0,277 | 21,6±7,8 | 0,6±0,7 | 0,7±0,1 |
| ES | 0,111±0,167 | 21,8±8,9 | 1,5±1,5 | 1,5±0,1 |
| CE | 0,036±0,038 | 34,1±13,5 | 3,3±3,5 | 3,4±0,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 0,097±0,035 | 25,1±8,7 | 0,9±0,8 | 0,9±0,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 0,134±0,074 | 56,5±31,1 | 1,9±1,9 | 1,9±0,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 0,064±0,044 | 45,1±44,5 | 1,5±0,3 | 0,9±0,9 |
| CpG (ODN1826) | 0,116±0,046 | 52,6±24,1 | 3,5±2,1 | 2,8±0,9 |
| CpG (ODN1826) +ES | 0,056±0,025 | 30,8±14,8 | 4,9±1,8 | 3,4±2,2 |
| CpG (ODN1826) +CE | 0,184±0,056 | 57,9±41,4 | 3,7±3,3 | 3,5±0,3 |

Por un lado, la presencia de ES y CE en solitario dio lugar a un aumento en la población CD11c- IL12+ y un descenso de la población CD11c- IL-10+ respecto al control.

La combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) causó una disminución de la población CD11c- IL-10+, así como un aumento de la población CD11c- IL-12+ respecto a ambos controles positivos en solitario. El incremento de la población CD11c- IL-12+ fue estadísticamente significativo para ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) individualmente ($p=0,044$) (Figura 57).

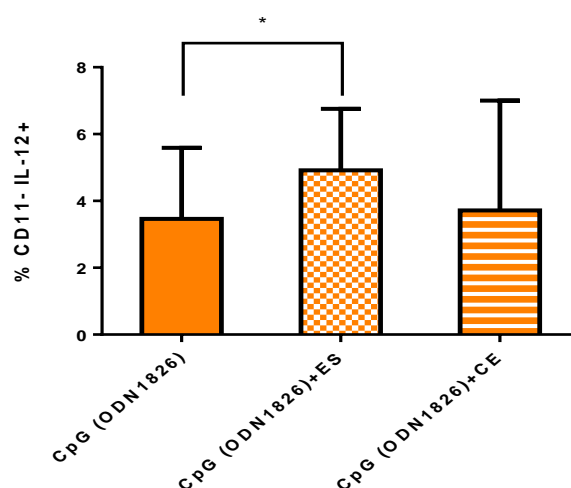


Figura 57. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,044$).

La combinación de LPS *E. coli* 026B6 con ES, así como de CpG (ODN1826) con CE, fueron las dos únicas situaciones en el que se produjo un aumento de la población CD11c- IL10+ respecto a ambos controles positivos.

2. EFECTO DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex* SOBRE LA SEÑALIZACIÓN CELULAR DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES BALB/C Y C57BL/6

Se estudió el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* en solitario, y sobre la acción de los distintos agonistas de TLR en ratones BALB/c y C57BL/6. Para ello, las BMDDCs se estimularon con ES o CE solos, o en combinación con cada uno de los agonistas de TLR ensayados. Tras las correspondientes incubaciones *in vitro* se determinaron, por un lado, los niveles de los marcadores de señalización celular, Myd88 y NF- κ B tras 12 h de estimulación; así como los niveles de activación celular en función de los marcadores de maduración CD80, CD86, MHCI y MHCII tras 24 h de estimulación, y la producción de citocinas IL-10, IL-12 y TNF- α , tras 12 h y/o 24 h de estimulación.

Los ligandos empleados fueron los descritos en la sección “Estimulación y caracterización de células murinas” del Capítulo de Materiales y Métodos: Pam3CSK4, agonista de TLR1 y 2 (0,1 μ g/ml); HKLM, agonista de TLR2 (10 exp 7 cells/ml); Poly (I:C) LMW y Poly (I:C), agonistas de TLR3 (ambos 1 μ g/ml); LPS *E. coli* K12 y LPS *E. coli* 026B6, agonistas de TLR4 (1 μ g/ml); ST-FLA, agonista de TLR5 (0,1 μ g/ml); FSL-1, agonista de TLR2 y 6 (0,1 μ g/ml); ssARN 40, agonista de TLR7 (0,25 μ g/ml), y CpG (ODN1826), agonista de TLR9 (50 μ g/ml).

En el caso concreto de LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) solo se describirán los resultados obtenidos de aquellos marcadores que no se analizaron en el apartado 1 (estudio del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón) del capítulo de Resultados, es decir, los correspondientes a TNF- α , Myd88 y NF κ B. Los mismos criterios se aplicarán a los resultados obtenidos de la estimulación con ES y CE en solitario, si bien siempre se incluirán en las tablas correspondientes como recordatorio.

Por último, aunque todo esto se realizó para las dos cepas de ratón estudiadas, BALB/c y C57BL/6, en el caso concreto de la cepa de ratón C57BL/6, las citocinas solo se estudiaron a un tiempo de estimulación (12 h) y los ligandos ST-FLA y ssARN 40 no se testaron.

2.1. Efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la señalización celular en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c

Las BMDDCs fueron estimuladas a día 6 de maduración, durante 24 h para el estudio de las moléculas de superficie (CD80, CD86, MHC I, MHC II), y durante 12 h y 24 h en el caso de las citocinas (IL-10, IL-12, TNF- α). Los niveles de los factores de transcripción ensayados (Myd88 y NF- κ B) se determinaron tras 12 h de estimulación. Se estimularon siempre con ES o CE en solitario, así como con los agonistas de los TLR, individualmente y en combinación con cada uno de ellos, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en ratones BALB/c se recogen en el siguiente apartado.

2.1.1. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la molécula de superficie CD11c⁺

En primer lugar se analizaron los cambios en la población CD11c⁺. La Tabla 37 recoge los resultados obtenidos.

La presencia de ES en solitario no dio lugar a cambios en la población CD11c⁺ respecto al control, mientras que la estimulación con CE originó un incremento.

Así mismo, de forma general, todos los ligandos de TLR causaron un aumento en la población CD11c⁺ respecto al control, con la excepción de FSL-1 y ssARN 40, que la disminuyeron.

La asociación de ES y CE con cada uno de los ligandos estudiados ocasionó dos respuestas opuestas: en el caso de la asociación con Pam3CSK4, HKLM y Poly (I:C), originaron un descenso en la población CD11c⁺ respecto a estos ligandos individualmente, mientras que al asociarlos con el resto de ligandos: Poly (I:C) LMW, LPS *E. coli* K12, ST-FLA, FSL-1 y ssARN 40, se produjo el efecto contrario.

La Figura 58 muestra los resultados obtenidos. El descenso en la población CD11c⁺ fue estadísticamente significativo en el caso de ES en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,038$). Por el contrario, el incremento de la población CD11c⁺ fue estadísticamente significativo en el caso de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,007$).

En cuanto a la expresión de CD11c, ES solo dio lugar a un leve incremento y CE la disminuyó respecto al control. Por su parte, la asociación de ES y CE con cada uno de los ligandos estudiados, ocasionó un suave descenso en la expresión de CD11c respecto a los ligandos en solitario para el caso de Pam3CSK4, HKLM, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW. El descenso en la expresión de CD11c fue estadísticamente significativo para la combinación de CE con HKLM respecto a HKLM en solitario ($p=0,041$). Por el contrario, la asociación de ES y CE con los ligandos restantes dio lugar a un aumento en la expresión de CD11c respecto a los ligandos en solitario, pero en ningún caso fue estadísticamente significativo (Figura 58).

Tabla 37. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones BALB/c. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c (%) | CD11c (GMean) |
|----------------------------|-----------|---------------|
| Control | 32,4±12,9 | 40,4±15,9 |
| ES | 32,9±16,2 | 41±14,4 |
| CE | 40,1±13,5 | 35,7±16,3 |
| Pam3CSK4 | 47,3±18,5 | 29,3±8,7 |
| Pam3CSK4+ES | 45,6±18,7 | 27,2±7,7 |
| Pam3CSK4+CE | 46,9±14,9 | 28,9±6,3 |
| HKLM | 52,0±10,4 | 29,2±6,6 |
| HKLM+ES | 52,8±10,8 | 29,3±7,5 |
| HKLM+CE | 49,4±12 | 28,7±6,5 |
| Poly (I:C) | 46,1±6,2 | 40,3±24,1 |
| Poly (I:C)+ES | 44,6±5,6 | 39,5±21 |
| Poly (I:C)+CE | 38,9±11,5 | 37,5±22,1 |
| Poly (I:C) LMW | 42,3±4,8 | 36,2±19,4 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 44,4±6,4 | 41,2±25,6 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 45,6±0,8 | 38,3±17,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 38,9±6,8 | 27,8±6,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 +ES | 43,1±15,4 | 28,8±8,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 40,5±12,0 | 27,6±5,5 |
| ST-FLA | 38,5±6,6 | 33,9±17 |
| ST-FLA+ES | 45,0±7,5 | 39,1±22,8 |
| ST-FLA+CE | 41,1±13,4 | 40,5±24,4 |
| FSL-1 | 25,7±2,5 | 20,4±1,6 |
| FSL-1+ES | 28,9±4,7 | 19,9±1,1 |
| FSL-1+CE | 28,2±2,4 | 20,5±1,3 |
| ssARN 40 | 24,4±1,6 | 20±1,5 |
| ssARN 40+ES | 26±5,3 | 20,4±2,4 |
| ssARN 40+CE | 21,5±5 | 18,3±1,1 |

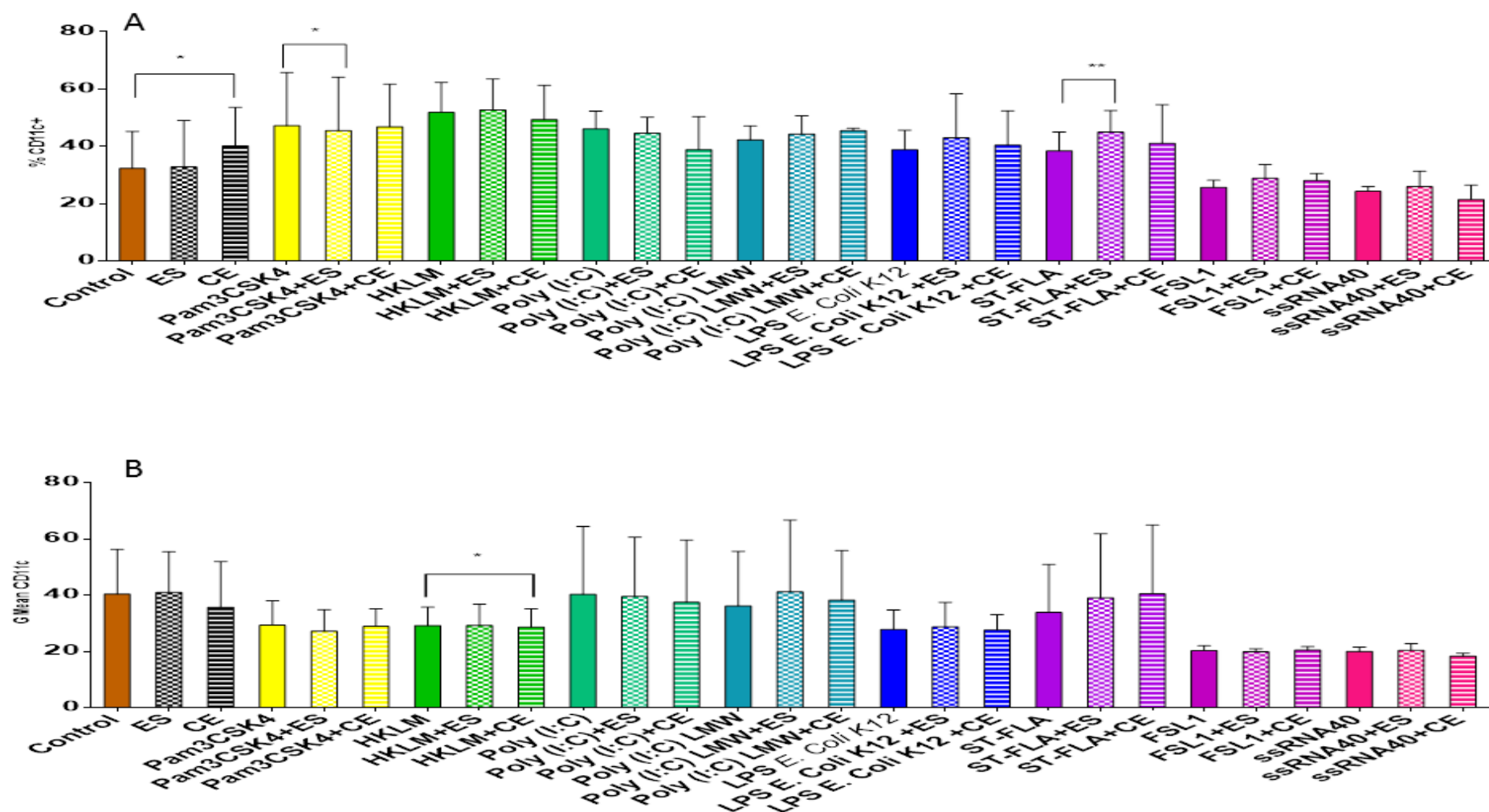


Figura 58. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la población CD11c+ fue estadísticamente significativo en presencia de solo CE respecto al control ($p=0,042$) y al asociar ES con ST-FLA respecto a solo ST-FLA ($p=0,007$). Además, el descenso en la población CD11c+ fue estadísticamente significativo al asociar ES con Pam3CSK4 respecto a solo Pam3CSK4 ($p=0,038$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c, así como su desviación estándar. La expresión de CD11c se vio significativamente disminuida en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,041$).

2.1.2. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la molécula coestimuladora CD80

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ CD80+. En la Tabla 38 se muestran los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación.

Tabla 38. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ CD80+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Además, la expresión de CD80 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) |
|-----------------------------|-----------|--------------|
| Control | 41,9±16,7 | 44,3±8,2 |
| ES | 46±15,2 | 69,9±11,4 |
| CE | 54,2±27,4 | 68,7±25,8 |
| Pam3CSK4 | 48,5±12,8 | 57,3±6,8 |
| Pam3CSK4 + ES | 42,7±10 | 52,8±0,4 |
| Pam3CSK4 + CE | 47,9±2,6 | 52,6±2,3 |
| HKLM | 49,5±2,1 | 53,3±5,6 |
| HKLM + ES | 45,7±0,5 | 49,4±3,9 |
| HKLM + CE | 50,8±1,4 | 57,2±6,2 |
| Poly (I:C) | 32,2±4,3 | 43,6±7,5 |
| Poly (I:C) + ES | 35,9±4,4 | 46,1±10,1 |
| Poly (I:C) + CE | 33,1±10 | 47,3±7,3 |
| Poly (I:C) LMW | 34,2±10,1 | 46,3±9,5 |
| Poly (I:C) LMW + ES | 33,7±15,1 | 45,9±11,4 |
| Poly (I:C) LMW + CE | 44,9±6,5 | 44,7±4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 53,5±10,3 | 70,8±2,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 + ES | 53±11,7 | 74,1±0,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 + CE | 53,7±10,5 | 71,7±1,7 |
| ST-FLA | 45,1±13,4 | 50,4±10,1 |
| ST-FLA + ES | 47,4±9,6 | 53,8±13,3 |
| ST-FLA + CE | 43±10,1 | 51,9±10,6 |
| FSL-1 | 41,1±4,8 | 38,5±2,6 |
| FSL-1 + ES | 42,4±2,9 | 37,7±0,9 |
| FSL-1 + CE | 34,7±6,9 | 39,8±3,3 |
| ssARN 40 | 47,2±5,4 | 39±4,9 |
| ssARN 40 + ES | 47,1±0,6 | 39,7±3,2 |
| ssARN 40 + CE | 53,2±6,8 | 36,1±1,7 |

La estimulación solo con ES y CE originó un leve aumento de la población CD11c+ CD80+. Este aumento fue cercano a la significancia en presencia de CE respecto al control ($p=0,05$) (Figura 23).

De forma general, la presencia de los ligandos individualmente dio lugar a un aumento de la población CD11c+ CD80+ respecto al control sin estimular, a excepción de Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, que la disminuyeron.

La asociación de ES con Pam3CSK4 o HKLM disminuyó levemente la población CD11c+ CD80+ respecto a ambos ligandos en solitario, mientras que CE la incrementó.

Por su parte, la asociación de ES con Poly (I:C) causó un aumento en la población CD11c+ CD80+, que fue estadísticamente significativo respecto a Poly (I:C) en solitario ($p=0,019$) (Figura 59). Por su parte, la asociación de CE con Poly (I:C) no dio lugar a cambios respecto a Poly (I:C) en solitario.

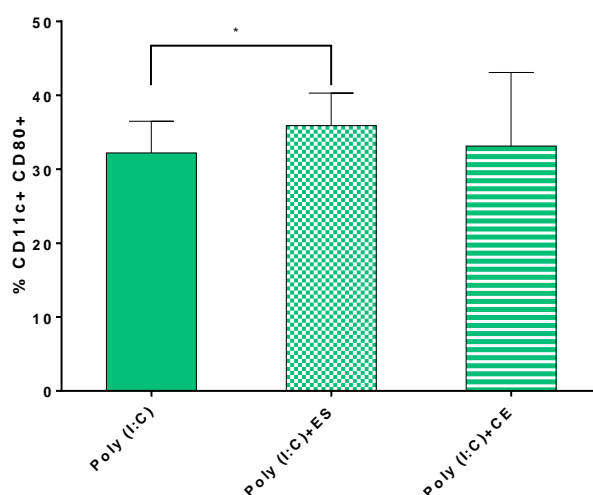


Figura 59. Resultados en ratones BALB/ tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80 + así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,019$).

La combinación de ES, tanto con Poly (I:C) LMW como con ssARN 40, apenas produjo cambios en la población CD11c+ CD80+ respecto a cada uno de los ligandos en solitario, mientras que la combinación con CE la incrementó. Por último, la combinación, tanto de ES como de CE con el resto de ligandos no originó apenas cambios en la población CD11c+ CD80+ respecto a los ligandos en solitario.

Además, se analizó la población CD11c- CD80+. La Tabla 39 recoge los resultados obtenidos.

Tabla 39. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- CD80+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) |
|---------------------------|-----------|--------------|
| Control | 8,9±7,9 | 44,4±6 |
| ES | 7,7±6,1 | 42,1±5,8 |
| CE | 14,7±14,4 | 44,2±6,8 |
| Pam3CSK4 | 7,1±4,8 | 42±0,5 |
| Pam3CSK4+ES | 7,2±5,2 | 40,1±0,7 |
| Pam3CSK4+CE | 8,4±7,6 | 39,7±0,7 |
| HKLM | 9,2±10,1 | 39,2±1,4 |
| HKLM+ES | 7,1±7,8 | 38,4±1,8 |
| HKLM+CE | 9,4±10,1 | 40,3±3,5 |
| Poly (I:C) | 3,7±4,1 | 40,6±10,1 |
| Poly (I:C)+ES | 4,8±5,8 | 44,9±14,6 |
| Poly (I:C)+CE | 4±3,3 | 44±14,1 |
| Poly (I:C) LMW | 3,9±4,1 | 42,2±11,4 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 3,2±3,1 | 42,9±12,1 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 8,1±10 | 40,9±7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 14,1±13,7 | 48,3±1,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 13,6±12 | 50,5±3,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 15,1±12,5 | 50,1±4,4 |
| ST-FLA | 8,4±7,2 | 45,4±13,1 |
| ST-FLA+ES | 7,8±7,1 | 48,9±15,5 |
| ST-FLA+CE | 8,6±9,2 | 51,3±19,6 |
| FSL-1 | 5,9±3,6 | 34,6±0,8 |
| FSL-1+ES | 5,4±2,3 | 34,8±0,5 |
| FSL-1+CE | 10,2±8,1 | 37±2,8 |
| ssARN 40 | 12,3±7,3 | 38±3,1 |
| ssARN 40+ES | 11,4±5,8 | 38,2±1,8 |
| ssARN 40+CE | 6,2±1,6 | 36,7±1,8 |

La presencia de ES apenas modificó la población CD11c- CD80+, mientras que la estimulación con CE la incrementó levemente respecto al control negativo. En cuanto a la estimulación con los ligandos en solitario, originó un aumento en la población CD11c- CD80+, excepto en el caso de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW, ST-FLA y FSL-1, que la disminuyeron respecto al control sin estimular.

La asociación de ES con los distintos ligandos apenas dio lugar a cambios en la población estudiada, mientras que la combinación con CE originó, de forma general, un aumento en la población CD11c- CD80+ respecto a los ligandos en solitario. Solo en el caso de CE en combinación con ssARN 40 la población CD11c- CD80+ se vio disminuida respecto a ssARN 40 en solitario.

En cuanto a la expresión de CD80 en la población CD11c-, en la mayoría de los casos se mantuvo prácticamente uniforme respecto al control, si bien en el caso de CE en combinación con Pam3CSK4 su descenso fue estadísticamente significativo respecto a Pam3CSK4 en solitario ($p=0,047$) (Figura 60).

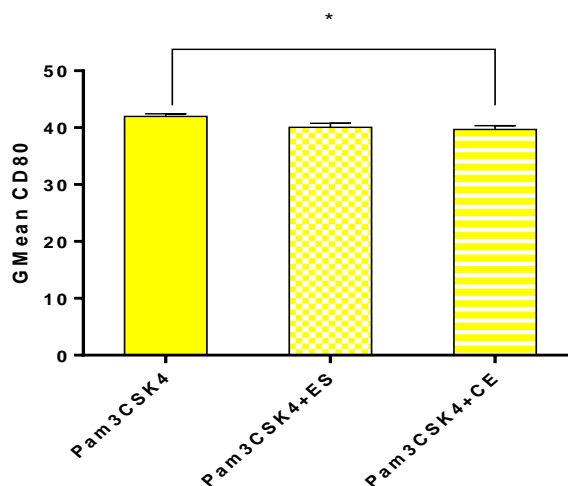


Figura 60. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de CD80 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,047$).

2.1.3. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la molécula coestimuladora CD86

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ CD86+. En la Tabla 40 se muestran los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación.

La presencia de ES y CE originó un aumento en la población CD11c+ CD86+ respecto al control sin estimular, que en ningún caso fue estadísticamente significativo, mientras que la estimulación con los ligandos en solitario originó un aumento en la población CD11c+ CD86+, excepto para Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, que la disminuyeron respecto al control negativo.

La asociación de ES y CE con los distintos ligandos apenas dio lugar a cambios en la población estudiada respecto al ligando en solitario, excepto en cuatro casos. Por su parte, la combinación de CE, tanto con Poly (I:C) como con Poly (I:C) LMW, incrementó la población CD11c+ CD86+ respecto a ambos ligandos en solitario. Por el contrario, la combinación de CE con ssARN 40 la disminuyó. Además, la asociación de ES con ST-FLA dio lugar a un incremento de dicha población respecto a ST-FLA solo.

En cuanto a la expresión de CD86 en la población CD11c+, esta se vio aumentada en la mayoría de los casos respecto al control. La estimulación con CE dio lugar a un incremento estadísticamente significativo en la expresión de CD86 respecto al control ($p=0,047$) (Figura

24). La presencia de ES y CE junto con los diferentes ligandos apenas modificó el efecto producido por los ligandos por sí mismos, excepto en los mismos cuatro casos indicados anteriormente.

Tabla 40. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c⁺ CD86⁺ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|----------------------------------|-----------|------------------|
| Control | 45,4±17 | 42,9±7,6 |
| ES | 48,2±14,8 | 40,5±4,2 |
| CE | 53,9±22,4 | 47,5±13,3 |
| Pam3CSK4 | 62,9±6,6 | 76,5±23,4 |
| Pam3CSK4+ES | 61,6±9,3 | 73,9±21,6 |
| Pam3CSK4+CE | 61,5±10,2 | 71,3±20,9 |
| HKLM | 67,5±2,9 | 70,6±15,5 |
| HKLM+ES | 66±0,8 | 69,1±18,2 |
| HKLM+CE | 68,7±1,5 | 71,8±15,4 |
| Poly (I:C) | 42,6±12,6 | 51,9±10,2 |
| Poly (I:C) +ES | 43,6±10,5 | 54,5±12,8 |
| Poly (I:C) +CE | 46,7±17,9 | 59±13,5 |
| Poly (I:C) LMW | 46,9±1,6 | 57,2±10 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 46,8±7,1 | 56,4±13,7 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 54,8±7,4 | 55,2±10,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 73,4±3,5 | 82,8±21,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 73,9±3,1 | 87,2±16,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 75,6±2,8 | 82,2±18 |
| ST-FLA | 53,6±9,1 | 66,6±18,1 |
| ST-FLA+ES | 59,8±5,6 | 69,3±15,8 |
| ST-FLA+CE | 53,6±7,9 | 64,6±13,6 |
| FSL-1 | 61,3±5,4 | 45,4±3,7 |
| FSL-1+ES | 59,2±4,1 | 45,6±2,3 |
| FSL-1+CE | 61,7±3 | 44,9±3,8 |
| ssARN 40 | 51±3 | 38,6±1,1 |
| ssARN 40+ES | 50,8±6,1 | 40,8±2,6 |
| ssARN 40+CE | 45,9±0,2 | 36,8±0,5 |

Por otro lado, se analizó la población CD11c⁻ CD86⁺. La Tabla 41 recoge los resultados obtenidos. En ella se puede observar que, en general, la población CD11c⁻ CD86⁺ no presentó grandes cambios bajo la estimulación de los diferentes antígenos empleados. La presencia de ES y CE en solitario dio lugar a valores muy similares a los del control, mientras que al utilizar los diferentes ligandos se ocasionó un leve aumento de la población estudiada respecto al control, con la única excepción de Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW que la disminuyeron.

La asociación de ES con los distintos ligandos apenas dio lugar a cambios en la población estudiada, mientras que la combinación con CE originó, de forma general, una disminución en la población CD11c⁻ CD86⁺ respecto a los ligandos en solitario. Solo en el caso de CE en

combinación con Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW la población CD11⁻ CD86⁺ se vio aumentada respecto a Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW individualmente.

Tabla 41. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11⁻ CD86⁺ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|---------------------------|----------|--------------|
| Control | 6,1±4,2 | 51,9±16,1 |
| ES | 6,1±4,4 | 50,8±9,8 |
| CE | 7,1±5,4 | 47,1±10 |
| Pam3CSK4 | 9±3,4 | 65,1±17,9 |
| Pam3CSK4+ES | 10,1±3,6 | 65,1±21,2 |
| Pam3CSK4+CE | 9,5±3,3 | 61,6±17,7 |
| HKLM | 8,1±3,9 | 63±15,5 |
| HKLM+ES | 6,5±3,9 | 63,8±17,5 |
| HKLM+CE | 7,8±6,5 | 62,4±15,5 |
| Poly (I:C) | 3,9±2 | 55,2±10,8 |
| Poly (I:C) +ES | 3,9±2,6 | 63,2±16,8 |
| Poly (I:C) +CE | 5,5±3,8 | 62,3±19,2 |
| Poly (I:C) LMW | 4,7±2,8 | 66,3±17,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 4±3,1 | 67,4±24,6 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 6±4,6 | 54,3±11,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 12,2±9,1 | 66,5±18,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 11,2±9,5 | 68,4±12,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 10,5±5,9 | 68,2±16,7 |
| ST-FLA | 8,9±6 | 68,5±20,5 |
| ST-FLA+ES | 7,6±4,7 | 75,4±19,7 |
| ST-FLA+CE | 5,4±4,1 | 71,5±19,1 |
| FSL-1 | 8,8±2,3 | 43,9±4,4 |
| FSL-1+ES | 8,6±2,5 | 42,9±5,7 |
| FSL-1+CE | 9,3±3,8 | 43±5,5 |
| ssARN 40 | 13,3±6,5 | 37,7±2,4 |
| ssARN 40+ES | 12,7±6,6 | 39,4±2,7 |
| ssARN 40+CE | 7,5±2,1 | 41,6±3,9 |

En cuanto a la expresión de CD86 en la población CD11⁻, si bien se vio incrementada respecto al control, al asociar los ligandos tanto con ES como con CE se mantuvo prácticamente estable respecto a su utilización en solitario. Tan solo en el caso de ES en presencia de ST-FLA el aumento en la expresión de CD86 fue estadísticamente significativo respecto a ST-FLA en solitario ($p=0,015$) (Figura 61).

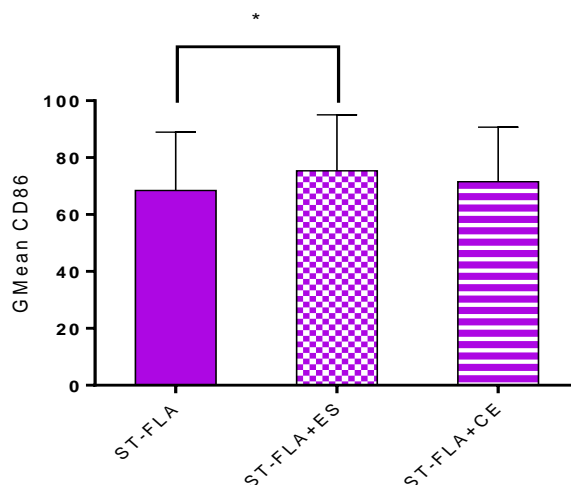


Figura 61. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86 en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de CD86 fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,015$).

2.1.4. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la molécula de superficie del complejo principal de histocompatibilidad MHC I

Se analizó la población CD11c+ MHC I+ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* tras 24 h de estimulación. En la Tabla 42 se muestran los resultados obtenidos.

La población CD11c+ MHC I+ no se vio modificada en presencia de ES, mientras que CE la aumentó respecto al control sin estimular. Así mismo, la estimulación con los ligandos de TLR en solitario dio en la mayoría de los casos un aumento en dicha población, a excepción de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que no dieron lugar a cambios o bien la disminuyeron respecto al control negativo.

Al asociar ES o CE a dichos ligandos, la población CD11c+ MHC I+ no presentó cambios respecto al ligando en solitario. Sin embargo, en el caso de HKLM, Poly (I:C) LMW, LPS *E. coli* K12 y ssARN 40, su combinación con ES o CE originó un descenso en dicha población respecto a los ligandos en solitario.

Tabla 42. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (GMean) |
|---------------------------|-----------|---------------|
| Control | 32,1±25,8 | 86,5±57,2 |
| ES | 31,9±24,1 | 89,9±65 |
| CE | 47,4±26,1 | 83,7±67,3 |
| Pam3CSK4 | 41,9±37 | 72,4±22,8 |
| Pam3CSK4+ES | 41,6±37,5 | 73,1±21,9 |
| Pam3CSK4+CE | 42,9±36,4 | 76,6±23,1 |
| HKLM | 40,3±37,4 | 76,8±28,4 |
| HKLM+ES | 35,5±32,9 | 77,5±21,4 |
| HKLM+CE | 34,8±29,7 | 75,3±20,9 |
| Poly (I:C) | 31,8±35,1 | 80,1±21,1 |
| Poly (I:C) +ES | 33,5±35,3 | 81,7±20,2 |
| Poly (I:C) +CE | 31,1±34 | 76,7±19,6 |
| Poly (I:C) LMW | 32,6±33,4 | 81±18 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 34,6±36,6 | 76,6±17,1 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 29,3±42,3 | 80±27,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 47,8±41,9 | 88,7±24,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 33,7±29 | 83,1±39,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 48,2±41,3 | 79,5±27,3 |
| ST-FLA | 32,7±42,1 | 86,6±35,3 |
| ST-FLA+ES | 30,4±42 | 79,7±29,5 |
| ST-FLA+CE | 12,6±12,5 | 72,7±38,7 |
| FSL-1 | 48,9±6,4 | 60,1±3 |
| FSL-1+ES | 49,7±2,5 | 60,5±0,7 |
| FSL-1+CE | 53,6±5 | 59,3±4,2 |
| ssARN 40 | 40,5±4 | 53,8±2 |
| ssARN 40+ES | 31,6±2 | 56,0±1,9 |
| ssARN 40+CE | 30,4±5,4 | 52,1±0,6 |

Por último, la expresión de MHC I en células CD11c+ se vio disminuida de forma general respecto al control. Sin embargo, en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 en solitario, la expresión de MHC I presentó un incremento estadísticamente significativo ($p=0,024$) (Figura 62).

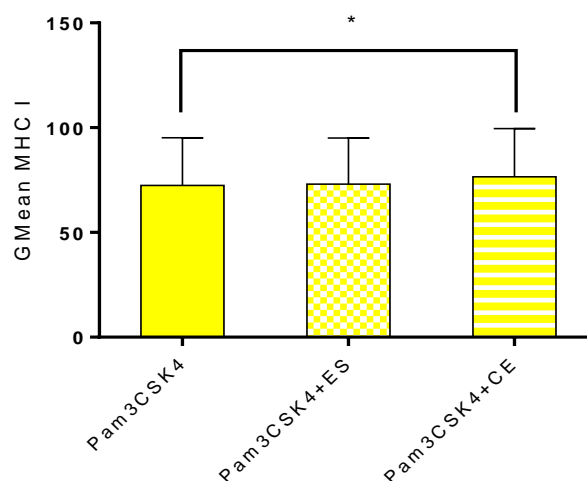


Figura 62. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto Pam3CSK4 solo ($p=0,024$).

En cuanto a la población de células que no expresaron el marcador CD11c (CD11c- MHC I+), la Tabla 43 recoge los resultados obtenidos. En ella se observa que la población CD11c- MHC I+ no se vio modificada en presencia de ES, mientras que CE la aumentó respecto al control. Así mismo, la estimulación con los ligandos de TLR en solitario dio en todos los casos un aumento en dicha población respecto al control.

Al asociar ES o CE a dichos ligandos, la población CD11c- MHC I+ no presentó cambios respecto al ligando en solitario. Sin embargo, en el caso de HKLM, LPS *E. coli* K12, ST-FLA y ssARN 40, su combinación con ES o CE originó un descenso en dicha población respecto a estos ligandos en solitario. La asociación de ES con ssARN 40 dio lugar a un descenso en la población CD11c- MHC I+ estadísticamente significativo respecto a ssARN 40 individualmente ($p=0,015$) (Figura 63).

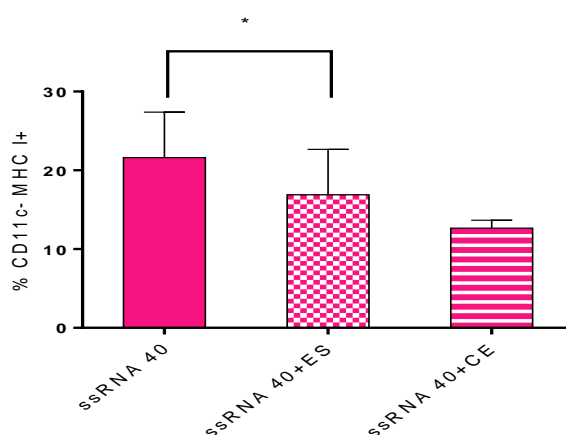


Figura 63. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES combinación con ssARN 40 respecto a ssARN 40 solo ($p=0,015$).

Tabla 43. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- MHC I+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (GMean) |
|---------------------------|-----------|---------------|
| Control | 9,6±9,1 | 62,2±24,7 |
| ES | 9,5±10,5 | 87,4±123,7 |
| CE | 16,4±14,3 | 73,7±56,5 |
| Pam3CSK4 | 11,2±9,6 | 55,4±24,5 |
| Pam3CSK4+ES | 10,7±9 | 64,4±28,4 |
| Pam3CSK4+CE | 9,6±8,8 | 65,5±21,3 |
| HKLM | 14,9±13,4 | 65,5±30,3 |
| HKLM+ES | 9,6±8,8 | 78,4±31 |
| HKLM+CE | 10,5±9,1 | 66,6±22 |
| Poly (I:C) | 11,2±9,7 | 114±82 |
| Poly (I:C) +ES | 12,9±11,2 | 86,2±36 |
| Poly (I:C) +CE | 11,3±10 | 61,6±25,4 |
| Poly (I:C) LMW | 12,1±10,5 | 59,4±26,7 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 11,9±10,7 | 74,6±23,1 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 12,5±17,4 | 63,9±16,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 17,3±15,3 | 73,8±26,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 12,5±19,6 | 87,8±41,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 17,7±15,6 | 70,3±28,9 |
| ST-FLA | 14,4±19 | 57,5±23,9 |
| ST-FLA+ES | 11,7±16,9 | 105,4±79,3 |
| ST-FLA+CE | 2,0±1,8 | 78,7±43,4 |
| FSL-1 | 18,6±4,8 | 53,2±3 |
| FSL-1+ES | 17,4±1,6 | 52,3±3 |
| FSL-1+CE | 20,2±9,1 | 49,4±4,9 |
| ssARN 40 | 21,6±5,8 | 51,7±6,1 |
| ssARN 40+ES | 16,9±5,8 | 52,2±4,3 |
| ssARN 40+CE | 12,7±1 | 54,2±2,9 |

2.1.5. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR, sobre la molécula de superficie del complejo principal de histocompatibilidad MHC II

Se analizó la población CD11c+ MHC II+ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* tras 24 h de estimulación. En la Tabla 44 se muestran los resultados obtenidos.

La estimulación tanto con ES como con CE no dio lugar a cambios en la población CD11c+ MHC II+ respecto al control negativo, mientras que los ligandos de TLR la incrementaron respecto al control negativo, con la excepción de FSL-1 y ssARN 40, que la disminuyeron.

Tabla 44. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|----------------------------------|------------|----------------|
| Control | 67,4±23,4 | 264±202 |
| ES | 70±22,1 | 262,4±195,5 |
| CE | 67,5±19,9 | 263±236 |
| Pam3CSK4 | 83,8±9,5 | 463,6±467,5 |
| Pam3CSK4+ES | 85,2±8,7 | 480,2±438 |
| Pam3CSK4+CE | 86,6±8,5 | 496,4±391,5 |
| HKLM | 85±10,9 | 516,1±412,8 |
| HKLM+ES | 82,6±14,5 | 517,1±402,1 |
| HKLM+CE | 85,9±9,8 | 497,8±403,9 |
| Poly (I:C) | 87,1±9,2 | 431,1±308,8 |
| Poly (I:C) +ES | 84,3±12,8 | 419,6±295,4 |
| Poly (I:C) +CE | 84,2±13,7 | 455,7±388 |
| Poly (I:C) LMW | 85,9±8,3 | 421±282,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 84,4±7,8 | 393,4±256,3 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 85,6±11,2 | 514,2±370 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 86,1±12,1 | 526,9±385,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 85,6±9,7 | 513±446,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 85,5±10,6 | 513,6±448,6 |
| ST-FLA | 85,8±9,9 | 540,5±380 |
| ST-FLA+ES | 85,2±9,8 | 536,8±348,1 |
| ST-FLA+CE | 89±5,7 | 574,3±238 |
| FSL-1 | 54,3±1,5 | 97,9±20 |
| FSL-1+ES | 53,5±1,3 | 97,3±20,1 |
| FSL-1+CE | 35,4±30,7 | 68±60,7 |
| ssARN 40 | 42,7±10,2 | 76,8±14,7 |
| ssARN 40+ES | 49,7±5,7 | 76,9±13,6 |
| ssARN 40+CE | 44±2,7 | 67,1±9,6 |

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos apenas originó cambios en la población CD11c+ MHC II+ respecto a cada uno de los ligandos individualmente, excepto en el caso de CE en combinación con FSL-1, que causó un descenso en dicha población respecto a FSL-1 en solitario.

En cuanto a la expresión de MHC II en las células CD11c+, la presencia de ES y CE no dio lugar a cambios respecto al control, mientras que todos los ligandos de TLR ensayados originaron un claro incremento en la expresión de dicha molécula respecto al control sin estimular.

Así mismo, la asociación de ES o CE con los ligandos de TLR modificó la expresión de MHC II+ respecto a cada uno de los ligandos aisladamente. De este modo, la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, FSL-1 y ssARN 40 disminuyó la expresión de MHC II respecto a cada uno de ellos en solitario. Por el contrario, la combinación de ES o CE con Pam3CSK4, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW incrementó la expresión de MHC II respecto a cada uno de ellos en solitario. En ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la población de células que no expresaron el marcador CD11c (CD11c- MHC II+), los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 45.

Tabla 45. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|---------------------------|------------|----------------|
| Control | 24,4±18,2 | 203±126,2 |
| ES | 24±19,9 | 174,6±146,6 |
| CE | 22,8±14,9 | 154,5±119,4 |
| Pam3CSK4 | 21,9±16,6 | 147,4±83,3 |
| Pam3CSK4+ES | 23,3±16 | 162,6±104,3 |
| Pam3CSK4+CE | 19,9±15,8 | 123,4±53,3 |
| HKLM | 19,7±15,3 | 126,8±84,9 |
| HKLM+ES | 19,6±16,8 | 118,7±76,5 |
| HKLM+CE | 18,6±17,1 | 110,1±79,5 |
| Poly (I:C) | 21,5±18,5 | 124,3±64,4 |
| Poly (I:C) +ES | 20,1±17,2 | 126,2±76,1 |
| Poly (I:C) +CE | 19,9±17,7 | 123,9±63,6 |
| Poly (I:C) LMW | 19,9±16 | 127,3±67,7 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 21,7±20,3 | 122,8±71,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 13,8±18,7 | 91,1±31,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 19,4±15,4 | 133,2±103,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 23,6±18,2 | 174,6±146,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 22,1±16,3 | 154,5±119,4 |
| ST-FLA | 15,1±19,2 | 97,7±41 |
| ST-FLA+ES | 14,9±19 | 100,8±48 |
| ST-FLA+CE | 4,4±4 | 100,3±52,4 |
| FSL-1 | 13,5±2,7 | 135,9±40,1 |
| FSL-1+ES | 13,2±2,4 | 129,5±38,4 |
| FSL-1+CE | 9,9±6,1 | 110,8±64,4 |
| ssARN 40 | 10,5±1,3 | 149,8±43,5 |
| ssARN 40+ES | 13,8±2,7 | 141,2±31,7 |
| ssARN 40+CE | 12,4±2,2 | 110,5±21 |

La presencia de ES o CE no modificó la población CD11c- MHC II+, mientras que la estimulación de los TLR con los ligandos originó un descenso respecto al control sin estimular.

Por otro lado, la combinación de ES o CE con cada uno de los ligandos, en general, no ocasionó cambios, si bien, en el caso de LPS *E. coli* K12 y ssARN 40 dio lugar a un incremento de la población CD11c- MHC II+ respecto a LPS *E. coli* K12 y ssARN 40 en solitario. Por el contrario, la combinación de ES o CE con Poly (I:C) LMW, ST-FLA y FSL-1 tuvo el efecto contrario, siendo estadísticamente significativo en el caso de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA individualmente ($p=0,038$) (Figura 64).

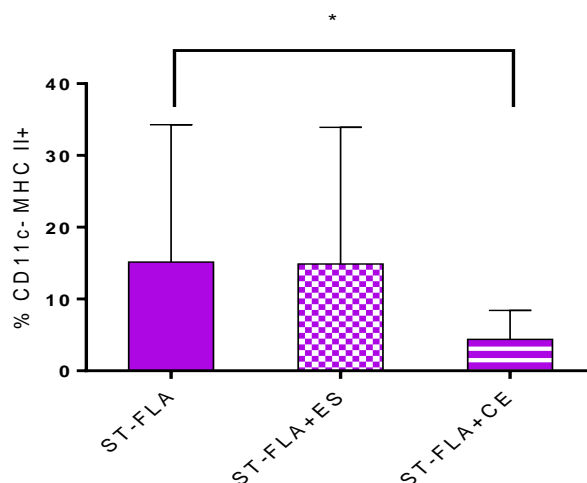


Figura 64. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,038$).

Finalmente, la expresión de MHC II en las células CD11c- fue inferior en presencia de ES y CE respecto al control, así como bajo la estimulación de todos los ligandos de los TLR ensayados.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* K12 incrementó la expresión de MHC II respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario, mientras que con HKLM, Poly (I:C) LMW y FSL-1 tuvo el efecto contrario. En el caso de CE en combinación con HKLM dicho incremento fue estadísticamente significativo respecto a HKLM individualmente ($p=0,035$) (Figura 65).

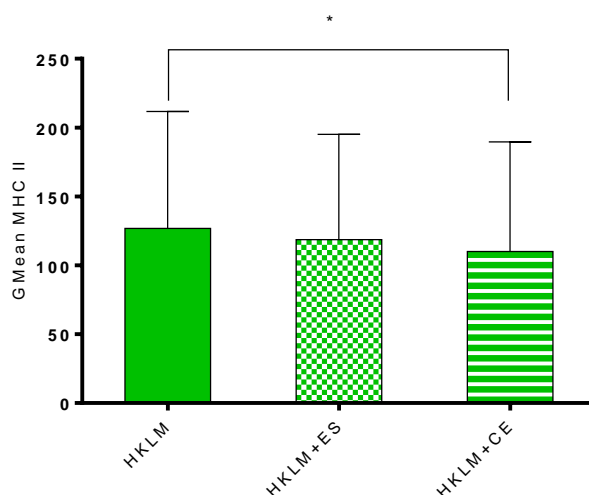


Figura 65. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con HKLM respecto HKLM solo ($p=0,035$).

2.1.6. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre las moléculas de superficie del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHCII

Además de estudiar de forma independiente la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHC II, se determinó la expresión de ambas de forma simultánea en las células CD11c⁺; es decir, se realizó un marcaje triple con CD11c, MHC I y MHC II, obteniéndose tres poblaciones diferenciadas: CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁺, CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁻ y CD11c⁺ MHC I⁻ MHC II⁺.

Al igual que para los marcadores anteriores, las determinaciones correspondientes se realizaron tras 24 h de estimulación. Se emplearon los antígenos larvarios de *A. simplex* y/o todos los ligandos de TLR junto con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6. En la Tabla 46 se recogen los resultados obtenidos.

La población CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁺ no se vio modificada en presencia de ES y CE respecto al control, mientras que la mayoría de los ligandos ensayados la aumentaron respecto a ese control. Solo en el caso de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW, FLS-1 y ssARN 40, la población de células CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁺ disminuyó respecto al control.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos dio lugar, de forma general, a un descenso en dicha población, siendo estadísticamente significativo en el caso de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,035$) (Figura 66).

La única excepción fue la combinación de ES con LPS *E. coli* 026B6, en cuyo caso tuvo lugar un leve incremento de la población CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁺ respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario.

En cuanto a la expresión de MHC I y MHC II en las células CD11c⁺, en general presentaron un perfil contrario; es decir, el aumento en la expresión de una estuvo acompañado por el descenso en la expresión de la otra, y viceversa.

Así, la estimulación con ES o CE dio lugar a valores de expresión de MHC I muy similares a los del control, mientras que la expresión de MHC II se vio disminuida. Por su parte, la estimulación con los ligandos de TLR, originó un incremento en la expresión de ambas moléculas, MHC I y MHC II, excepto Pam3CSK4, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, que disminuyeron MHC I respecto al control, y Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que disminuyeron la expresión de MHC II respecto al control.

En el caso de CpG (ODN1826) y HKLM, la asociación de ES o CE con los diferentes ligandos originó un descenso en la expresión de MHC I respecto a ambos ligandos en solitario. Dicha disminución fue estadísticamente significativa para CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) aisladamente ($p=0,024$) (Figura 66).

Por el contrario, la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y ST-FLA dio lugar a un incremento en la expresión de MHC I respecto a ambos ligandos en solitario, siendo

estadísticamente significativo para ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,03$) (Figura 67).

Tabla 46. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ MHC I+ MHC II+ (%) | MHC I+ (GMean) | MHCII+ (GMean) |
|-----------------------------|------------------------------|----------------|----------------|
| Control | 15,1±7,6 | 76,6±8,6 | 188,1±126,8 |
| ES | 14,4±9 | 74±5,5 | 171,9±108,8 |
| CE | 17±11,7 | 77,2±7,7 | 177,5±137,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 51,1±12,6 | 149,2±55,7 | 197,7±291,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 55±10,3 | 178,2±75,7 | 214,6±320,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 51±11,5 | 153,8±59 | 181,9±284 |
| CpG (ODN1826) | 55±12,4 | 116,8±33,7 | 217,9±283,6 |
| CpG (ODN1826) +ES | 54,5±13,1 | 105,5±24 | 235,8±319,4 |
| CpG (ODN1826) +CE | 50,5±14 | 103,7±26,5 | 209,1±285,4 |
| Pam3CSK4 | 21,7±0,1 | 70,7±12,1 | 235±224,5 |
| Pam3CSK4+ES | 23,6±1,7 | 71,4±12,1 | 276,2±251,9 |
| Pam3CSK4+CE | 22,1±1,4 | 75±13,1 | 251,1±198,9 |
| HKLM | 24,9±4,3 | 80,8±7,9 | 249,7±228,1 |
| HKLM+ES | 16,8±2,2 | 72±13,1 | 251,6±238,6 |
| HKLM+CE | 15,7±3,2 | 72,7±11,4 | 234,5±239,5 |
| Poly (I:C) | 16,1±3,6 | 73,4±11,2 | 226,7±175,9 |
| Poly (I:C) +ES | 18,3±2,7 | 75,8±12,3 | 234,2±213,6 |
| Poly (I:C) +CE | 13,7±2,4 | 72,1±11,8 | 197,4±181,8 |
| Poly (I:C) LMW | 14,8±1,2 | 75,2±12,2 | 182,9±170,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 14,8±5 | 78±8 | 250,7±214 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 10,7±14,9 | 95±37,5 | 78,2±26 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 30,6±3,3 | 83,9±6,5 | 274,6±297,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 22,2±26,2 | 85,2±2,5 | 324,6±351,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 30,4±3,8 | 87,1±9,4 | 303,2±338 |
| ST-FLA | 11,7±16 | 164,7±149,4 | 77,8±11,7 |
| ST-FLA+ES | 10,8±14,9 | 94,3±45,6 | 77,7±16,8 |
| ST-FLA+CE | 10±9 | 94,7±86,6 | 41,6±5 |
| FSL-1 | 12,6±2,3 | 83,9±6,5 | 201,1±51,9 |
| FSL-1+ES | 12±0,7 | 85,2±2,5 | 205,7±77,1 |
| FSL-1+CE | 11±3,7 | 87,1±9,4 | 145,3±97,8 |
| ssARN 40 | 8,7±0,9 | 81,8±10,2 | 198±53,2 |
| ssARN 40+ES | 8,1±0,7 | 78,6±5 | 246,2±70,4 |
| ssARN 40+CE | 7±0,7 | 78,2±2,5 | 206,1±65,7 |

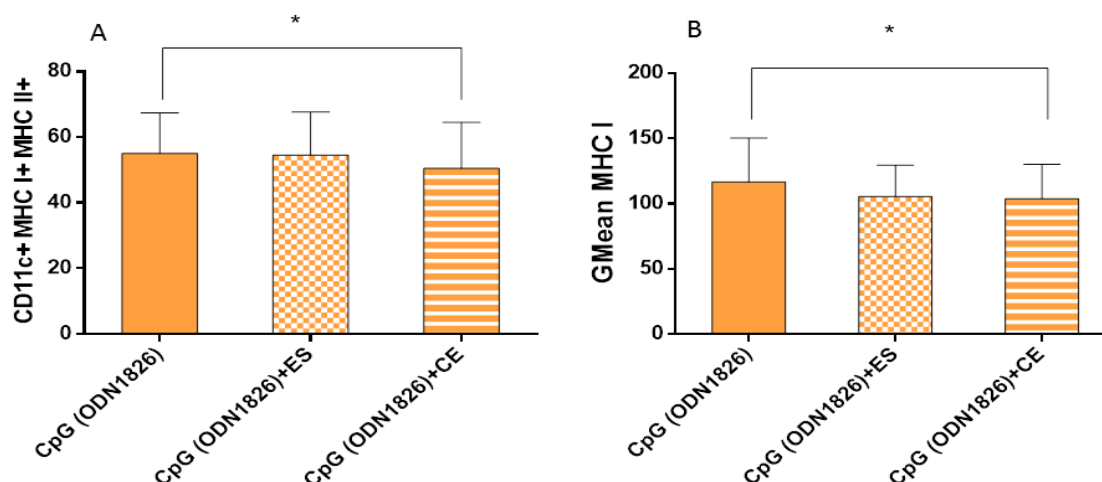


Figura 66. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,035$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,024$).

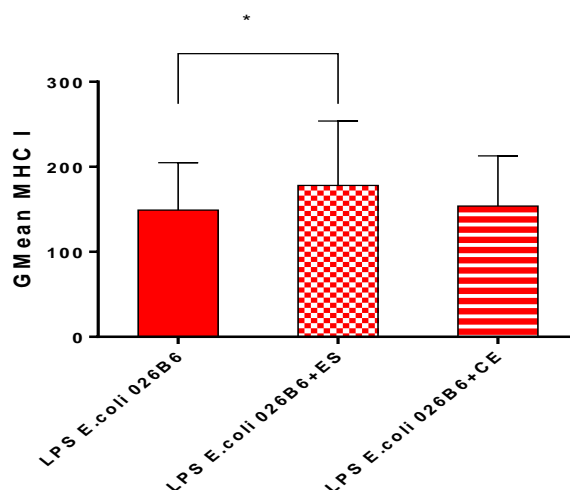


Figura 67. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,03$).

Por último, la expresión de MHC II siguió un perfil ligeramente inverso al de MHC I al asociarse ES o CE con los diferentes ligandos ensayados, pero en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En segundo lugar, se analizó la población CD11c+ MHC I- MHC II+. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 47.

Tabla 47. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ MHC I- MHC II+ (%) | MHC II+ (GMean) |
|------------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Control | 33,7±15,9 | 78,4±74,7 |
| ES | 33±17,7 | 72,4±67,4 |
| CE | 26,6±9,4 | 77,2±93,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 10,5±8,4 | 75,3±94,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 8,4±8 | 87±116,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 8,1±8,7 | 80,9±110,2 |
| CpG (ODN1826) | 12,2±4,7 | 80,2±102,6 |
| CpG (ODN1826) +ES | 12,1±2 | 86,9±118,9 |
| CpG (ODN1826) +CE | 12,9±7,3 | 83,2±107,9 |
| Pam3CSK4 | 30,3±3,4 | 122,6±115,5 |
| Pam3CSK4+ES | 32,2±0,2 | 159,2±157,2 |
| Pam3CSK4+CE | 34,1±0,5 | 109,4±83,1 |
| HKLM | 32,6±1,3 | 138,7±130,9 |
| HKLM+ES | 37,9±1,2 | 130±122,7 |
| HKLM+CE | 38,8±0,5 | 128±126,8 |
| Poly (I:C) | 40,7±3,3 | 137,4±122,1 |
| Poly (I:C) +ES | 37,8±2,1 | 139,5±131,9 |
| Poly (I:C) +CE | 40,5±5,8 | 120,5±114,5 |
| Poly (I:C) LMW | 36,3±2,5 | 131,9±131,4 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 41,7±0,4 | 134,9±113,2 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 18,8±25,9 | 62,3±7,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 22,5±2,7 | 125,3±122,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 31,9±12,9 | 146,1±156,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 23,6±3,9 | 135,5±139,6 |
| ST-FLA | 18,8±25,8 | 64,1±7,6 |
| ST-FLA+ES | 19,6±26,9 | 61,3±2 |
| ST-FLA+CE | 18,5±24,3 | 65,8±17,9 |
| FSL-1 | 13,5±1 | 62±14,4 |
| FSL-1+ES | 13,9±1,5 | 62,8±16,7 |
| FSL-1+CE | 10,2±5,9 | 55,1±20,7 |
| ssARN 40 | 12,6±3,5 | 59,5±13,5 |
| ssARN 40+ES | 17,3±1,7 | 64,3±14,2 |
| ssARN 40+CE | 15,4±1,8 | 53,7±13,1 |

En esos resultados se puede observar que el porcentaje de células CD11c+ MHC I- MHC II+ no se vio modificado por la presencia de ES en solitario, pero sí se vio incrementado por CE respecto al control y ese aumento fue estadísticamente significativo ($p=0,029$) (Figura 68).

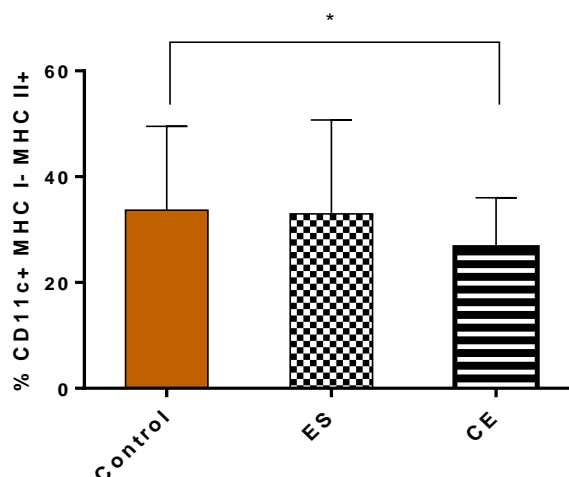


Figura 68. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I- MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE solo respecto al control ($p=0,029$).

Excepto Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, la estimulación con el resto de ligandos de TLR incrementó la población CD11c+ MHC I- MHC II+ respecto al control sin estimular.

Por su parte, la asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ensayados dio lugar a un incremento de la población estudiada respecto a los ligandos en solitario en el caso de LPS *E. coli* K12 y ssARN 40, Mientras que en el caso de LPS *E. coli* 026B6 y Poly (I:C) LMW ocurrió lo contrario.

En lo que se refiere a la expresión de MHC II, esta se vio incrementada en todos los casos respecto al control negativo, excepto en presencia de ST-FLA, FSL-1 y ssARN 40. Al combinar ES o CE con los ligandos de TLR la expresión de MHC II se vio, en general, incrementada respecto a los ligandos en solitario. Sin embargo, en el caso de CE, su asociación con HKLM, Poly (I:C) LMW, FSL-1 y ssARN 40 originó un descenso en la expresión de MHC II respecto a estos ligandos aisladamente, si bien, en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por último, se analizó la población CD11c+ MHC I+ MHC II-. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 48.

Tabla 48. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I+ MHC II- en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ MHC I+ MHC II- (%) | MHC I+ (GMean) |
|-----------------------------|---------------------------|----------------|
| Control | 8,3±3,9 | 60,3±11,2 |
| ES | 8,2±4,2 | 59,3±9,5 |
| CE | 8,8±3,7 | 61,4±12,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 13,9±4,2 | 73,2±7,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 16,3±4,5 | 84,7±13,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 16,2±2,8 | 78,4±11,6 |
| CpG (ODN1826) | 12±1,6 | 70,7±5,3 |
| CpG (ODN1826) +ES | 14±3,1 | 78,4±11,6 |
| CpG (ODN1826) +CE | 11,5±2,2 | 70,2±4 |
| Pam3CSK4 | 7,7±1,3 | 57,2±6,7 |
| Pam3CSK4+ES | 11,8±9,5 | 69,2±22,8 |
| Pam3CSK4+CE | 7,2±2,6 | 57,3±7,6 |
| HKLM | 13,9±5,7 | 74±10,5 |
| HKLM+ES | 8,2±1,5 | 59,4±5,1 |
| HKLM+CE | 9,4±0,9 | 60,7±4,2 |
| Poly (I:C) | 8,6±2,6 | 65,8±5,9 |
| Poly (I:C) +ES | 10±0,4 | 66,6±3,6 |
| Poly (I:C) +CE | 9,4±0,1 | 64,5±4,9 |
| Poly (I:C) LMW | 11,2±1,1 | 66,6±2,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 9,6±2,3 | 65,2±4,1 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 10,4±0,7 | 62,1±2,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 9,5±1,2 | 64,4±4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 5,9±7,8 | 62,1±17,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 11,1±1,2 | 67,3±6,4 |
| ST-FLA | 13,5±2,4 | 67,3±13,3 |
| ST-FLA+ES | 9,8±0,2 | 62,5±6,4 |
| ST-FLA+CE | 4,9±3,0 | 58,4±14,5 |
| FSL-1 | 4,7±2 | 50,8±1,8 |
| FSL-1+ES | 4,8±0,7 | 50,4±0,5 |
| FSL-1+CE | 8,3±4 | 50,1±3,2 |
| ssARN 40 | 8,4±4 | 54±3,2 |
| ssARN 40+ES | 5±2,5 | 52,6±2,2 |
| ssARN 40+CE | 3,1±0,8 | 52,1±1,3 |

En presencia de ES o CE, el porcentaje de células CD11c+ MHC I+ MHC II+ no presentó cambios respecto al control. Tampoco en presencia de los ligandos ensayados se originaron prácticamente modificaciones respecto al control en esa población.

Por su parte, la asociación de ES o CE con los ligandos LPS *E. coli* 026B6, y FSL-1 ocasionó un incremento de la población celular, mientras que la combinación con HKLM, LPS *E. coli* K12, ST-FLA y ssARN 40 tuvo el efecto contrario.

En el caso de CE en combinación con LPS *E. coli* K12, el aumento de la población CD11c+ MHC I+ MHC II- fue estadísticamente significativo respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario ($p=0,014$),

mientras que la estimulación conjunta de CE con ST-FLA provocó un descenso de esa población, que fue estadísticamente significativo respecto a ST-FLA solo ($p=0,029$) (Figura 69).

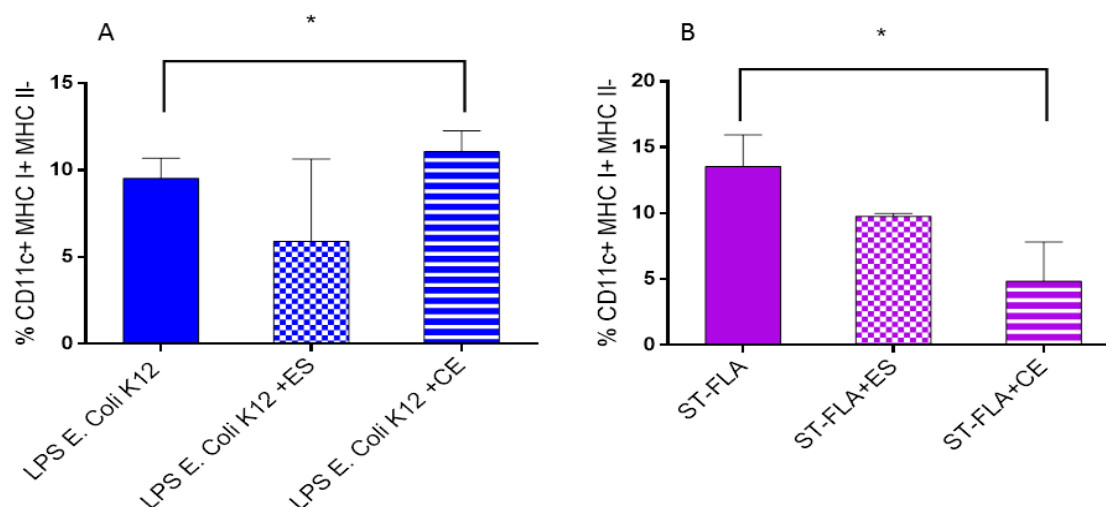


Figura 69. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II- así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,014$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II-, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,029$).

Finalmente, la expresión de MHC I en esta población no se vio afectada por la acción de ES o CE en solitario, mientras que los ligandos de TLR la incrementaron respecto al control negativo. Solo en el caso de Pam3CSK4, FSL-1 y ssARN 40, la expresión de MHC I se vio disminuida respecto al control sin estimular.

La asociación de ES o CE con los distintos ligandos, dio lugar, en general, a un incremento en la expresión de MHC I, el cual fue estadísticamente significativo para ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a este ligando en solitario ($p=0,013$) (Figura 70).

En el caso concreto de la asociación de ES o CE con HKLM y ST-FLA disminuyó la expresión de MHC I respecto a ambos ligandos en solitario.

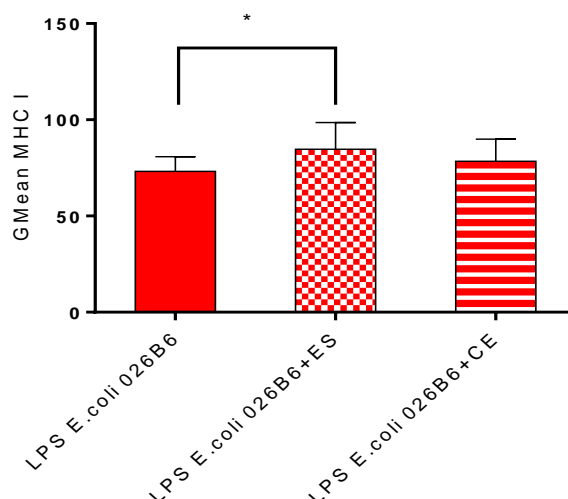


Figura 70. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,013$).

2.1.7. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la citocina IL-10

La expresión intracelular de la IL-10 se determinó tras 12 h y 24 h de estimulación. Así, se analizó el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ y su nivel de expresión intracelular (GMean). En la Tabla 49 se muestran los resultados obtenidos.

Tras 12 h de estimulación, la presencia de ES o CE en solitario no modificó el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ presentes respecto al control. Sin embargo, la estimulación con los ligandos de TLR dio lugar a un descenso en dicha población respecto al control, con la excepción de FSL-1 y ssARN 40 que la incrementaron.

La asociación de ES o CE con los ligandos de TLR mostró una tendencia discreta a disminuir la población CD11c+ IL-10+ respecto a los ligandos en solitario. Sin embargo, en el caso de ES en combinación con LPS *E. coli* K12, así como ES y CE con Poly (I:C) LMW, la población CD11c+ IL-10+ presentó un incremento respecto a ambos ligandos en solitario, que fue estadísticamente significativo en el caso de ES junto con Poly (I:C) LMW respecto a este ligando en solitario ($p=0,022$) (Figura 71).

En cuanto a la expresión intracelular de IL-10 en las células CD11c+ tras 12 h de estimulación, ES y CE incrementaron dicha expresión respecto al control, mientras que los ligandos de los TLR siempre la disminuyeron. La asociación tanto de ES como de CE con los ligandos no dio lugar a grandes cambios en la expresión intracelular de dicha citocina respecto a los ligandos en solitario.

Tabla 49. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-10+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10, 12 h (%) | IL-10, 12 h (GMean) | IL-10, 24 h (%) | IL-10, 24 h (GMean) |
|---------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| Control | 7±4,7 | 110,6±116,1 | 13,1±8,3 | 44,3±16,7 |
| ES | 6,7±3,4 | 154±250,5 | 11,9±9,3 | 40,1±10,6 |
| CE | 7±4,2 | 177,1±301,5 | 12,9±9,7 | 36,3±8,1 |
| Pam3CSK4 | 3,9±1,4 | 53±6,3 | 10,6±4,2 | 29,2±9,8 |
| Pam3CSK4+ES | 4,1±0,9 | 60,4±23,5 | 9,6±7,3 | 40,4±25,1 |
| Pam3CSK4+CE | 2,7±0,3 | 74,5±V | 6,1±1,5 | 45,4±4,1 |
| HKLM | 4,4±0,2 | 53,3±8,2 | 8,7±3,5 | 41,8±2,2 |
| HKLM+ES | 3,3±1,5 | 49±11,9 | 13,5±14,7 | 219,9±211,2 |
| HKLM+CE | 3,6±0,8 | 53,1±15,2 | 9,4±7,3 | 81,2±21,4 |
| Poly (I:C) | 4±1,5 | 51±19,9 | 17±8,1 | 28,1±7,4 |
| Poly (I:C) +ES | 4,2±0,9 | 54,8±11,1 | 31,5±36,8 | 31,8±10,3 |
| Poly (I:C) +CE | 3,3±1,1 | 55,1±7,3 | 37,5±40,1 | 30,6±10,8 |
| Poly (I:C) LMW | 3,2±1 | 53,3±14,2 | 11,9±2,3 | 33,7±16,7 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 7,7±1,4 | 59,9±24,5 | 15,5±0,4 | 26,4±7,9 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 7±1,5 | 52,3±7,6 | 11,8±0,9 | 23,9±6,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 2,9±0,1 | 62,1±18,8 | 14,6±14,9 | 34,7±6,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 8,6±4,4 | 45,6±17,9 | 9,9±8,7 | 59,3±11,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 2,3±0,7 | 53±13 | 13,5±2,3 | 28,3±3,9 |
| ST-FLA | 7,8±3,6 | 49,4±1,3 | 11±3,3 | 32,9±16,1 |
| ST-FLA+ES | 9,1±5,3 | 44±6 | 13,2±3,8 | 31,4±12,6 |
| ST-FLA+CE | 14,8±13,2 | 55,2±17,4 | 13,7±4,8 | 31,5±13,3 |
| FSL-1 | 9,9±1,2 | 70,3±15 | - | - |
| FSL-1+ES | 11,3±2,1 | 57,2±6,3 | - | - |
| FSL-1+CE | 9,7±3,7 | 57±21,5 | - | - |
| ssARN 40 | 11,4±3,3 | 52,9±4,7 | - | - |
| ssARN 40+ES | 13,3±6,1 | 57,3±7,7 | - | - |
| ssARN 40+CE | 8,3±3,4 | 65±15,6 | - | - |

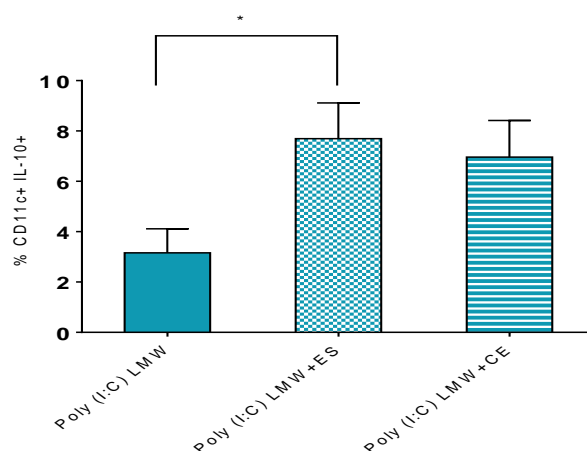


Figura 71. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-10+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,022$).

Por otro lado, se analizaron también los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación. La presencia de ES y CE presentó un porcentaje de células CD11c⁺ IL-10⁺ muy similar al del control, mientras que, al igual que ocurría tras 12 h de estimulación, los ligandos de los TLR causaron una disminución de dicha población respecto al control. Solo en el caso de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y LPS *E. coli* K12 se pudo observar un leve incremento de estas células respecto al control.

La asociación de ES o CE con los ligandos de TLR mostró una tendencia a disminuir la población CD11c⁺ IL-10⁺ respecto a cada uno de los ligandos, con la excepción de HKLM, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, que la incrementaron.

Por último, tras 24 h de estimulación, la expresión de IL-10 en células CD11c⁺ se vio disminuida, de forma general, respecto al control sin estimular, así como respecto a cada uno de los ligandos cuando estos se asociaron a ES o CE.

No obstante, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c⁻ IL-10⁺, obteniéndose los resultados que se reflejan en la Tabla 50.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c⁻ IL-10⁺ no se vio modificada respecto al control negativo por la presencia de solo ES o CE, mientras que la estimulación con los ligandos de TLR la incrementó, con la única excepción de FSL-1 y ssARN 40.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, Poly (I:C) LMW y ST-FLA ocasionó un incremento de la población CD11c⁻ IL-10⁺ respecto a estos ligandos en solitario. Por el contrario, la asociación con el resto de ligandos de TLR tuvo el efecto contrario, si bien en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por su parte, la expresión de IL-10 en células CD11c⁻ se vio incrementada por la presencia de ES y CE respecto al control, pero la estimulación con los ligandos de TLR presentó el efecto contrario, excepto en el caso de FSL-1 y ssARN 40 que la aumentaron respecto al control negativo.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos tras 12 h no dio lugar apenas a cambios en la expresión de IL-10 respecto a cada uno de los ligandos en solitario, excepto para Poly (I:C) que la aumentó, y FSL-1 y ssARN 40 que la disminuyeron.

Tabla 50. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- IL-10+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10, 12 h (%) | IL-10, 12 h (GMean) | IL-10, 24 h (%) | IL-10, 24 h (GMean) |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| Control | 1,4±0,9 | 71,6±59,5 | 1,05±1,00 | 32,2±17,4 |
| ES | 1,2±1 | 96,6±98,2 | 1,32±1,24 | 39,2±32 |
| CE | 1,3±1,2 | 85,4±86,5 | 0,87±0,89 | 28,2±17,2 |
| Pam3CSK4 | 3,3±2,5 | 41,4±15 | 0,46±0,55 | 37,2±29 |
| Pam3CSK4+ES | 3,3±2,4 | 40,4±12,9 | 0,26±0,31 | 26,1±15,3 |
| Pam3CSK4+CE | 1,6±1,9 | 49,4±35,6 | 0,39±0,41 | 36,8±29 |
| HKLM | 2,5±2,9 | 35,7±16,7 | 0,58±0,64 | 53,3±51,4 |
| HKLM+ES | 2,7±2,4 | 36,5±9,8 | 0,65±0,78 | 123,3±149,1 |
| HKLM+CE | 2,7±2,3 | 40,8±6,5 | 0,36±0,34 | 105±120,3 |
| Poly (I:C) | 3,4±2,6 | 34,9±12,4 | 1,11±1,09 | 22,5±8,7 |
| Poly (I:C) +ES | 3,1±2,5 | 43,9±15,1 | 4,52±6,09 | 28,3±13 |
| Poly (I:C) +CE | 1,9±1,2 | 42,7±15,8 | 7,35±8,24 | 20,8±8,2 |
| Poly (I:C) LMW | 1,9±1,3 | 39,3±18,4 | 1,06±1,51 | 24,1±14,7 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 5,9±4,4 | 39,4±11,0 | 1,46±1,89 | 14,9±0,2 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 4,5±3,2 | 47,7±12,7 | 1,05±1,32 | 14,3±0,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 2,1±1,5 | 50,6±29,9 | 0,25±0,07 | 32,9±20 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 7,6±6,1 | 32,8±4,4 | 0,24±0,15 | 74,3±79,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 1,9±1,4 | 42±13,5 | 1,94±2,59 | 43,7±40,4 |
| ST-FLA | 4,6±2,5 | 40,8±13,7 | 1,40±1,21 | 26,9±19,2 |
| ST-FLA+ES | 7,5±7,3 | 35,6±8,8 | 2,84±2,38 | 28,6±16,4 |
| ST-FLA+CE | 12,4±15,5 | 49,4±22,6 | 2,76±2,31 | 25,3±17,5 |
| FSL-1 | 0,4±0,1 | 188,9±152,1 | - | - |
| FSL-1+ES | 0,6±0,3 | 172,8±131,8 | - | - |
| FSL-1+CE | 0,4±0,2 | 117,2±112 | - | - |
| ssARN 40 | 0,5±0,1 | 108,5±99,4 | - | - |
| ssARN 40+ES | 1,2±1,1 | 81±49,3 | - | - |
| ssARN 40+CE | 0,4±0,1 | 122,7±53,2 | - | - |

Por último, decir que el aumento en la expresión intracelular de IL-10 en células CD11c- tras 12 h de estimulación fue estadísticamente significativo para ES en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,032$) (Figura 72).

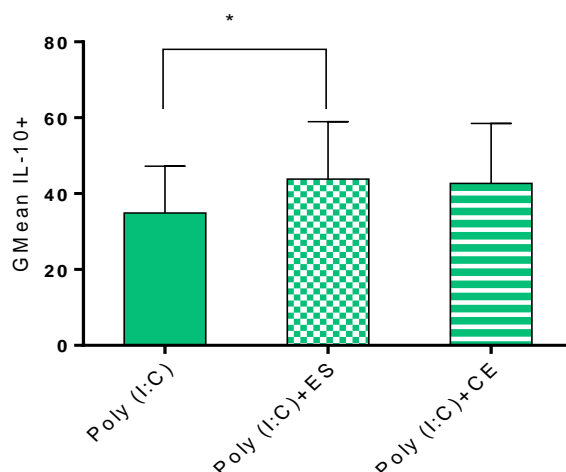


Figura 72. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-10 en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de IL-10 fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) respecto Poly (I:C) solo ($p=0,032$).

2.1.8. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la citocina IL-12

La expresión intracelular de la IL-12 se determinó tras 12 h y 24 h de estimulación.

En primer lugar, se analizó el porcentaje de células CD11c+ IL-12+ y su nivel de expresión intracelular (GMean). En la Tabla 51 se muestran los resultados obtenidos.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c+ IL-12+ no se vio modificada por la presencia de ES o CE respecto al control negativo, mientras que la estimulación con los ligandos de TLR sí que la incrementó, con la única excepción de ST-FLA.

Por su parte, la asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó un descenso de las células CD11c+ IL-12+ respecto a la actuación de los ligandos en solitario, en especial en el caso de la combinación de ES con LPS *E. coli* K12, HKLM, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por su parte, la expresión de IL-12 en células CD11c+ se vio suavemente incrementada por la presencia de ES y CE respecto al control, especialmente por CE, y la estimulación con los ligandos de TLR la incrementó claramente, excepto en el caso de ssARN 40 que no la modificó respecto al control sin estimular.

En cuanto a la asociación de ES o CE con los diferentes ligandos, tras 12 h no se produjeron apenas cambios en la expresión de IL-12 en comparación con cada uno de los ligandos en solitario, excepto cuando se asociaron a HKLM, Poly (I:C) y ST-FLA, que la aumentaron respecto a los ligandos en solitario. Además, la asociación de ES con LPS *E. coli* K12 disminuyó la expresión intracelular de la IL-12 respecto a solo LPS *E. coli* K12. Tampoco en este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 51. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-12, 12 h (%) | IL-12, 12 h (GMean) | IL-12, 24 h (%) | IL-12, 24 h (GMean) |
|---------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| Control | 13,7±8,4 | 45,4±9,9 | 43,1±25,9 | 29,7±6,2 |
| ES | 13,4±8,6 | 46,2±10,6 | 53,8±28,3 | 32,8±6,2 |
| CE | 14,3±7,2 | 48,4±13,7 | 52,6±25,1 | 34±7,2 |
| Pam3CSK4 | 47,8±3,1 | 80,1±27,7 | 30,9±19,5 | 25,3±8,5 |
| Pam3CSK4+ES | 44,2±2,6 | 90,1±36,3 | 39,2±38,7 | 25,6±6,6 |
| Pam3CSK4+CE | 46,7±2,5 | 85,7±31,8 | 31,2±20,4 | 25±7,9 |
| HKLM | 42,5±8 | 77,2±27,4 | 30,5±15,9 | 28,1±7,1 |
| HKLM+ES | 34,9±22,7 | 95,5±41,9 | 23,5±1,2 | 30±4,8 |
| HKLM+CE | 28,7±36,8 | 66,7±19,3 | 33,4±8,2 | 28,8±7,6 |
| Poly (I:C) | 19±8,1 | 62,4±21,1 | 45,9±10,7 | 33,3±14,4 |
| Poly (I:C) +ES | 17,9±11,3 | 67,2±28,7 | 32,1±5,6 | 28,4±7,3 |
| Poly (I:C) +CE | 14,6±9,7 | 58,6±19,5 | 34,6±10,3 | 28,5±8,5 |
| Poly (I:C) LMW | 19,4±15,7 | 63,3±19,7 | 40,2±14,2 | 30±10,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 22,8±9 | 70,2±26 | 44,9±11 | 27,7±11 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 11,7±2,4 | 68,7±21,9 | 41,7±26 | 29,1±14 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 52,8±0,8 | 82,4±31,7 | 45,4±40,1 | 26,5±5,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 24,8±26,8 | 51,9±3,4 | 37,1±25,5 | 25,7±6,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 55,2±2,5 | 80,4±29,6 | 32,6±39,3 | 28,8±11,5 |
| ST-FLA | 10,2±0,2 | 66,1±15,2 | 50±17,2 | 34,8±14,8 |
| ST-FLA+ES | 9,9±0,3 | 84,6±40,5 | 43,9±15,8 | 31,3±10,4 |
| ST-FLA+CE | 9,9±9,3 | 70,6±29,6 | 35,5±22,2 | 30,6±10,2 |
| FSL-1 | 15,9±5,2 | 46,9±2,1 | - | - |
| FSL-1+ES | 14,2± | 47,9±1,9 | - | - |
| FSL-1+CE | 17,3±1,6 | 43,2±2 | - | - |
| ssARN 40 | 26,1±3 | 40,3±2,8 | - | - |
| ssARN 40+ES | 30,1±4 | 40,6±1,6 | - | - |
| ssARN 40+CE | 24,6±5,9 | 39,5±2 | - | - |

Por otro lado, se analizaron los cambios producidos en la población CD11c+ IL-12+ tras 24 h de estimulación. En este caso, la presencia de ES y CE incrementó dicha población respecto al control sin estimular, siendo estadísticamente significativo para ES (Figura 31), mientras que la estimulación con todos los ligandos de los TLR no dio lugar a grandes cambios. Así mismo, la asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos solo modificó el porcentaje de células CD11c+ IL-12+ respecto a los ligandos en solitario en el caso de LPS *E. coli* K12, Poly (I:C) y ST-FLA, para los que la población CD11c+ IL-12+ se vio disminuida. En el caso de ES en combinación con LPS *E. coli* K12, el descenso de la población CD11c+ IL-12+ fue estadísticamente significativo respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,026$) (Figura 73).

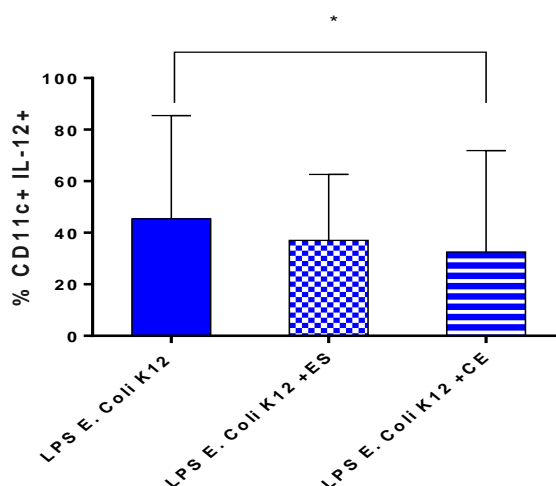


Figura 73. Resultado en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,026$).

Respecto a la expresión intracelular de la IL-12 tras 24 h de estimulación, se vio incrementada levemente por ES o CE en relación con el control negativo y en el resto de casos estudiados tampoco se produjeron grandes cambios.

Por último, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c- IL-12+. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 52.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c- IL-12+ no se vio modificada por la presencia de ES o CE respecto al control, mientras que la estimulación con los ligandos de TLR en solitario la incrementó, con la única excepción de ssARN 40.

Por su parte, la asociación de ES o CE con los ligandos dio lugar, de forma general, a un descenso de la población CD11c- IL-12+ respecto a aquellos en solitario. Se destaca que la combinación de CE con Pam3CSK4 dio lugar a un descenso estadísticamente significativo respecto a Pam3CSK4 en solitario ($p=0,039$) (Figura 74).

En cuanto a la expresión de IL-12 en células CD11c-, se vio incrementada tanto por la presencia de ES y CE como por cada uno de los ligandos de los TLR ensayados respecto al control sin estimular.

Por su parte, la asociación de ES o CE con esos ligandos presentó perfiles encontrados. Así, la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, FSL-1 y ssARN 40 dio lugar a un descenso en la expresión intracelular de IL-12 respecto a estos ligandos en solitario y, por el contrario, la combinación de ES con HKLM, Poly (I:C) LMW y ST-FLA provocó un aumento.

El descenso en la expresión de IL-12 al asociar CE con ssARN 40 fue estadísticamente significativo respecto a ssARN 40 en solitario ($p=0,045$) (Figura 75).

Tabla 52. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-12, 12 h (%) | IL-12, 12 h (GMean) | IL-12, 24 h (%) | IL-12, 24 h (GMean) |
|---------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| Control | 0,73±0,39 | 47,6±5,7 | 8,1±8,4 | 19,7±5,6 |
| ES | 0,87±0,57 | 49,4±7,6 | 14,9±12,1 | 22,5±8,2 |
| CE | 0,78±0,34 | 51,8±7 | 11±7,6 | 22,9±8,7 |
| Pam3CSK4 | 6,69±0,69 | 68±12,6 | 2,3±2,6 | 16,2±0,8 |
| Pam3CSK4+ES | 5,86±1,77 | 72,3±13,9 | 3±0,5 | 15,1±1,6 |
| Pam3CSK4+CE | 5,85±0,5 | 66,4±10,2 | 3,1±3,2 | 16,5±0,3 |
| HKLM | 7,83±1,43 | 86,7±25,6 | 3,3±3,9 | 21,3±4,4 |
| HKLM+ES | 5,07±4,52 | 136,4±46,8 | 4,1±5,3 | 24,3±6,9 |
| HKLM+CE | 5,44±7,86 | 79,9±19,2 | 5,1±6,1 | 22,4±4,4 |
| Poly (I:C) | 1,94±0,12 | 60±2,4 | 8,3±5,5 | 25,3±17 |
| Poly (I:C) +ES | 1,55±0,21 | 51,8±5,6 | 5,1±5,1 | 21,2±10 |
| Poly (I:C) +CE | 1,2±0,37 | 65,2±16,7 | 6,4±7,8 | 22,2±11,2 |
| Poly (I:C) LMW | 3,13±1,69 | 63,9±8,3 | 6,9±7,3 | 22,1±8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 2,75±0,26 | 61,8±12,3 | 8,2±10,9 | 16,7±2,5 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 0,96±0,80 | 154,5±174,6 | 9,7±13,1 | 17,2±2,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 12,73±5,69 | 75,8±17,2 | 4,2±1,4 | 15,4±0,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 2,98±3,65 | 50,1±3,1 | 3,9±3,1 | 16,7±1,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 12,2±5,86 | 70,9±13,3 | 1,1±1 | 16,4±1,3 |
| ST-FLA | 1,02±0,88 | 172,1±193,9 | 10,4±8,8 | 25,5±16,4 |
| ST-FLA+ES | 0,59±0,49 | 366,4±541 | 10,4±13,1 | 22,2±9,3 |
| ST-FLA+CE | 0,29±0,26 | 134,9±118,8 | 8,7±13,4 | 22,8±10 |
| FSL-1 | 4,05±1,25 | 92,8±14,1 | - | - |
| FSL-1+ES | 4,31±0,87 | 83,2±7,8 | - | - |
| FSL-1+CE | 2,74±2,17 | 74,9±13 | - | - |
| ssARN 40 | 0,7±0,22 | 56,8±2,3 | - | - |
| ssARN 40+ES | 0,57±0,21 | 48,6±12,5 | - | - |
| ssARN 40+CE | 1,43±0,23 | 45,1±2,7 | - | - |

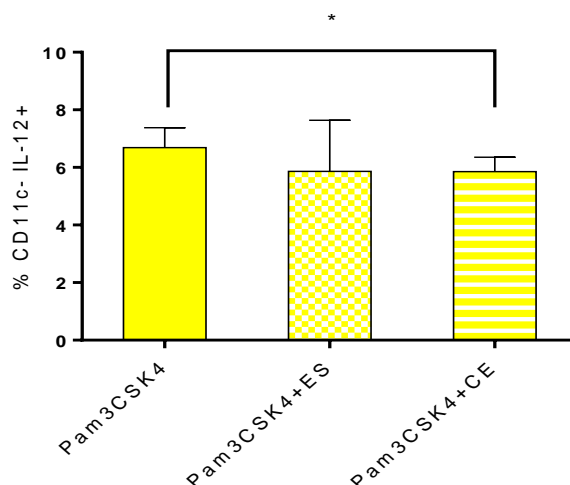


Figura 74. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con PAM3CSK4 respecto a PAM3CSK4 solo ($p=0,039$).

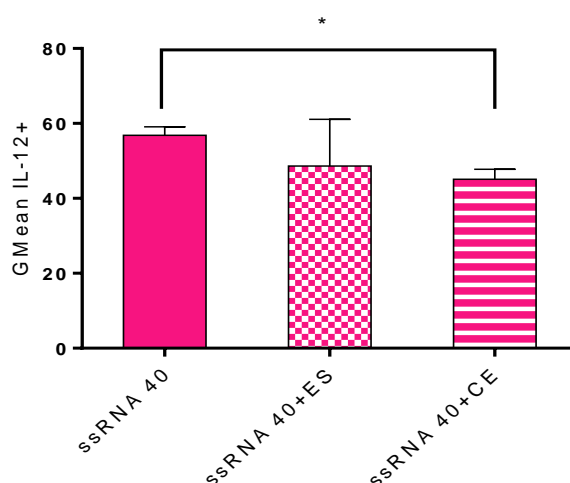


Figura 75. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ssARN 40 respecto ssARN 40 solo ($p=0,045$).

Se analizaron, así mismo, los cambios producidos en la población CD11c- IL-12+ tras 24 h de estimulación. En este caso la presencia de ES y CE incrementó la población respecto al control. Sin embargo, la estimulación con los ligandos de los TLR no provocó tal incremento, aunque sí lo hizo la expresión intracelular de la IL-12 respecto al control.

Respecto a la asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos, esta no dio lugar a grandes cambios, ni en el porcentaje de células CD11c- IL-12+ ni en la expresión intracelular de la IL-12 respecto a los ligandos en solitario.

Fueron estadísticamente significativos respecto al control el incremento en la población CD11c- IL-12+ en presencia de CE y el aumento en la expresión intracelular de IL-12 en presencia de ES y CE (nombrado en apartado anterior).

2.1.9. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión intracelular de la citocina TNF- α

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ TNF- α + en función de los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, respecto al control, así como su interacción con los distintos ligandos de los TLR ensayados.

En el caso concreto de esta citocina, solo se testó tras 12 h de estimulación. Además, se incluyeron los datos obtenidos al estimular con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6, además del resto que se venían ensayando hasta ahora. Los resultados se recogen en la Tabla 53.

Como se puede observar, la población CD11c+ TNF- α + no se vio modificada por la presencia de ES o CE respecto al control, mientras que la estimulación con los ligandos de TLR sí que la incrementó, con la única excepción de LPS *E. coli* K12, FSL-1 y ssARN 40 que o no la modificaron o bien la disminuyeron.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó un incremento de las células CD11c+ TNF- α + respecto a los ligandos en solitario, en especial en el caso de CpG (ODN1826), LPS *E. coli* K12 en combinación con ES, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW con ES. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por su parte, la expresión intracelular de TNF- α en células CD11c+ no se vio modificada por la presencia de ES o CE respecto al control, mientras que la estimulación con los ligandos de TLR la incrementó, excepto en el caso de LPS *E. coli* K12, FSL-1 y ssARN 40, que la disminuyeron.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos no dio lugar a cambios en la expresión de TNF- α respecto a los ligandos en solitario. Solo en el caso de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 la expresión intracelular de TNF- α se vio disminuida respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,045$) (Figura 76).

Tabla 53. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ TNF- α + en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | TNF- α (%) | TNF- α (GMean) |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Control | 13,6 \pm 16 | 24,5 \pm 16,5 |
| ES | 12,2 \pm 14,1 | 24,2 \pm 16,1 |
| CE | 15,3 \pm 17,7 | 24,8 \pm 16,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 24,6 \pm 17,2 | 32,4 \pm 16,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 25,3 \pm 16,3 | 32 \pm 16 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 23,3 \pm 8,8 | 31,5\pm15,9 |
| CpG (ODN1826) | 23,3 \pm 8,8 | 33,2 \pm 13,7 |
| CpG (ODN1826) +ES | 30,8 \pm 19,4 | 34,5 \pm 14,9 |
| CpG (ODN1826) +CE | 33,2 \pm 23,4 | 33,1 \pm 15,1 |
| Pam3CSK4 | 21,8 \pm 4,7 | 24,1 \pm 12,9 |
| Pam3CSK4+ES | 25 \pm 5,6 | 27,1 \pm 14,6 |
| Pam3CSK4+CE | 26,3 \pm 7,2 | 26 \pm 13,8 |
| HKLM | 22,4 \pm 3,1 | 27,9 \pm 13,5 |
| HKLM+ES | 23,7 \pm 1,6 | 28,9 \pm 15,8 |
| HKLM+CE | 19,2 \pm 11,5 | 28,4 \pm 17,7 |
| Poly (I:C) | 19,6 \pm 13,2 | 23,8 \pm 14,9 |
| Poly (I:C) +ES | 27,1 \pm 22,6 | 26,8 \pm 16,6 |
| Poly (I:C) +CE | 32,4 \pm 36,6 | 39,8 \pm 40,9 |
| Poly (I:C) LMW | 19,8 \pm 13,1 | 31,7 \pm 20,6 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 17,6 \pm 8,5 | 24 \pm 14,9 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 27,4 \pm 25,5 | 51,2 \pm 62,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 12,8 \pm 11,6 | 21,2 \pm 16,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 34,2 \pm 25,7 | 19,7 \pm 15,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 12,7 \pm 9,5 | 21,7 \pm 16,7 |
| ST-FLA | 26,6 \pm 22 | 50,3 \pm 48,1 |
| ST-FLA+ES | 24,4 \pm 22,2 | 42,4 \pm 33,9 |
| ST-FLA+CE | 25,6 \pm 24,7 | 42,9 \pm 32,9 |
| FSL-1 | 8,2 \pm 4,7 | 8,3 \pm 0,7 |
| FSL-1+ES | 7,9 \pm 2,6 | 8,7 \pm 1,1 |
| FSL-1+CE | 7,1 \pm 2,9 | 8,6 \pm 1,1 |
| ssARN 40 | 7,2 \pm 2,1 | 8,1 \pm 0,3 |
| ssARN 40+ES | 7,5 \pm 3,3 | 7,8 \pm 0,4 |
| ssARN 40+CE | 7,1 \pm 6,8 | 9,4 \pm 1,8 |

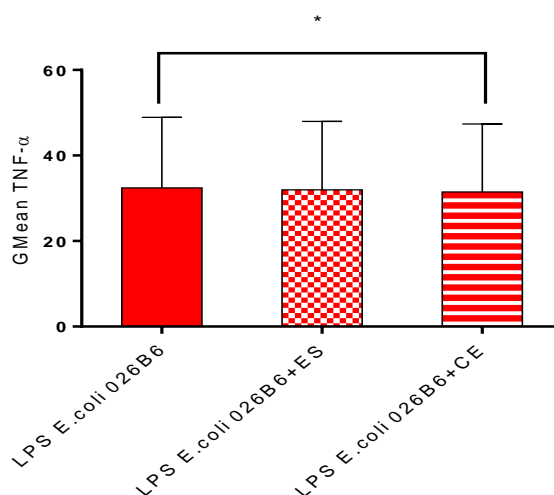


Figura 76. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,045$).

Por último, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c- TNF- α +. En la Tabla 54 se muestran los resultados obtenidos.

La presencia de ES o CE no dio lugar a cambios en la población CD11c- TNF- α respecto al control sin estimular. La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c- TNF- α respecto a los ligandos en solitario para CpG (ODN1826), Pam3CSK4, Poly (I:C), ST-FLA y FSL-1. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para ES en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 en solitario ($p=0,046$) (Figura 77).

Por el contrario, la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y ssARN 40 originó un descenso en la población CD11c- TNF- α respecto a ambos ligandos en solitario.

Respecto a la expresión intracelular de TNF- α +, la presencia de ES o CE en solitario no la modificó respecto al control. Por su parte, en la mayoría de los casos, la estimulación con los ligandos de los TLR o no originó cambios o bien mostró una tendencia a disminuir la expresión respecto al control.

Tabla 54. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | TNF- α (%) | TNF- α (GMean) |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Control | 4,3 \pm 5,7 | 27,5 \pm 23,4 |
| ES | 3,7 \pm 4,8 | 28 \pm 22,7 |
| CE | 4,2 \pm 6,2 | 27,3 \pm 21,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 7,2 \pm 5 | 31,1 \pm 16,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 6,6 \pm 5,1 | 33,7 \pm 19,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 6,9 \pm 4,1 | 32,4 \pm 17,7 |
| CpG (ODN1826) | 6,9 \pm 4,5 | 36,9 \pm 16,5 |
| CpG (ODN1826) +ES | 8,9 \pm 7,9 | 33,1\pm14,1 |
| CpG (ODN1826) +CE | 9,2 \pm 7,6 | 29,2\pm11,6 |
| Pam3CSK4 | 6,5 \pm 1,9 | 21 \pm 12,7 |
| Pam3CSK4+ES | 7,5\pm1,4 | 22,7\pm12,6 |
| Pam3CSK4+CE | 7,2 \pm 2,8 | 22,1 \pm 13,7 |
| HKLM | 6 \pm 1,7 | 24 \pm 11,5 |
| HKLM+ES | 5,5 \pm 3,8 | 25,9 \pm 15,6 |
| HKLM+CE | 5,6 \pm 5,5 | 24,3 \pm 15,1 |
| Poly (I:C) | 5,3 \pm 7 | 20,6 \pm 14,6 |
| Poly (I:C) +ES | 7 \pm 6,9 | 23,5 \pm 14,9 |
| Poly (I:C) +CE | 13,9 \pm 22,9 | 29 \pm 22,4 |
| Poly (I:C) LMW | 5,1 \pm 5,4 | 28,6 \pm 20,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 4,4 \pm 4,9 | 24,2 \pm 19 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 4,6 \pm 5,8 | 29,8 \pm 21 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 4 \pm 4,4 | 17,6 \pm 14,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 4,6 \pm 1,6 | 19,9 \pm 19,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 4 \pm 3,4 | 18,6 \pm 14,7 |
| ST-FLA | 3,2 \pm 3,3 | 38,7 \pm 27 |
| ST-FLA+ES | 4,6 \pm 5,1 | 34,5 \pm 21,2 |
| ST-FLA+CE | 4,3 \pm 5,7 | 30,9 \pm 21,3 |
| FSL-1 | 3,3 \pm 0,3 | 7,2 \pm 0,3 |
| FSL-1+ES | 3,8 \pm 0,9 | 7,4 \pm 0,8 |
| FSL-1+CE | 15,5 \pm 21,1 | 6,7 \pm 1,1 |
| ssARN 40 | 4,8 \pm 5,1 | 15,6 \pm 13,4 |
| ssARN 40+ES | 2 \pm 0,1 | 8 \pm 1,4 |
| ssARN 40+CE | 2,6 \pm 1,3 | 8,2 \pm 1,5 |

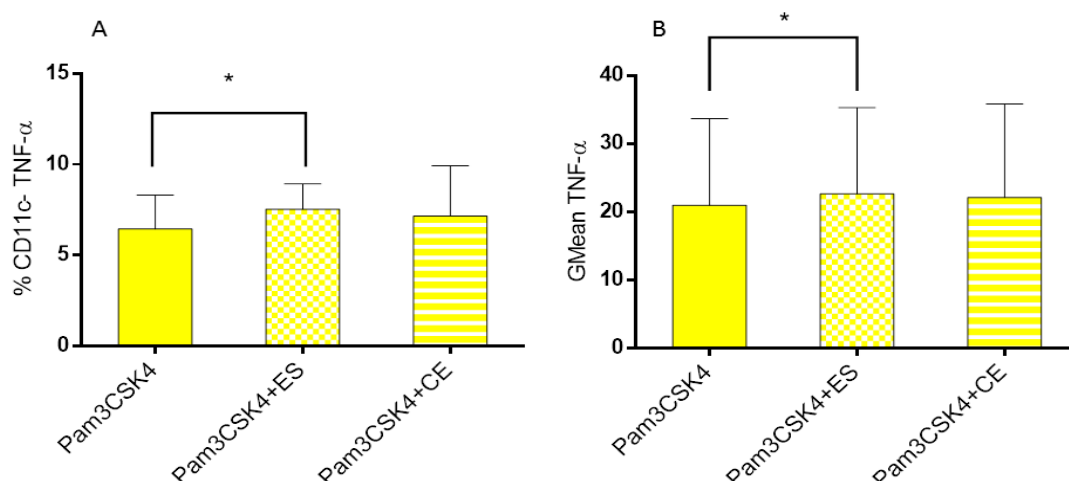


Figura 77. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- TNF- α +, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con PAM3CSK4 respecto a PAM3CSK4 solo ($p=0,046$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Pam3CSK4 respecto Pam3CSK4 solo ($p=0,015$).

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó el descenso en la expresión de TNF- α respecto a los ligandos en solitario para CpG (ODN1826), ST-FLA y ssARN 40, En el caso de ES o CE en combinación con CpG (ODN1826) el descenso en la expresión intracelular de esta citocina fue estadísticamente significativo para ambos casos respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,042$ y $p=0,01$, respectivamente) (Figura 78).

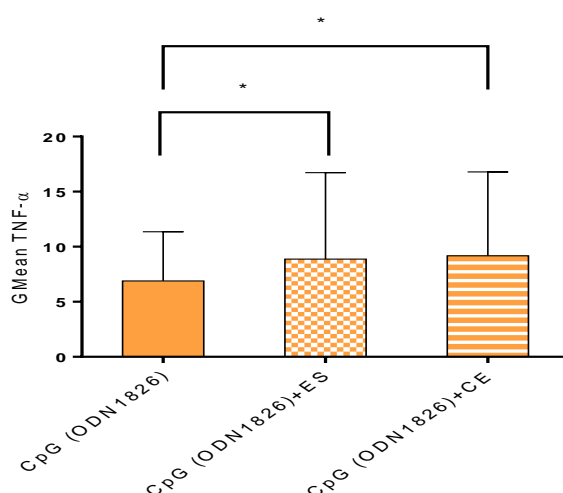


Figura 78. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo tanto en presencia de ES como de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,042$, $p=0,01$, respectivamente).

Por otro lado, la asociación de ES o CE con Pam3CSK4, HKLM y Poly (I:C), ocasionó un incremento en la expresión intracelular de esta citocina respecto a los ligandos en solitario, siendo estadísticamente significativo el incremento de TNF- α en el caso de la combinación de ES con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 en solitario ($p=0,015$) (Figura 77).

2.1.10. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre las citocinas IL-12 y TNF- α

Además de estudiar de manera independiente la expresión intracelular de las citocinas IL-12 y TNF- α , se determinó la expresión de ambas de forma simultánea en las células CD11c⁺; es decir, se realizó un marcaje triple con CD11c, IL-12 y TNF- α , obteniéndose tres poblaciones diferenciadas: CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁺, CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁻ y CD11c⁺ IL-12⁻ TNF- α ⁺.

Las determinaciones correspondientes se realizaron tras 12 h de estimulación. Se emplearon los antígenos larvarios de *A. simplex* y/o todos los ligandos de TLR previamente indicados, además de CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6.

En primer lugar, se analizaron los resultados obtenidos para la población CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁺. En la Tabla 55 se recogen los resultados obtenidos.

La presencia de ES o CE no modificó el porcentaje de células CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁺ respecto al control, mientras que, en general, los ligandos de TLR la aumentaron.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR afectó de distinta manera a la población según el ligando. En el caso concreto de CpG (ODN1826), HKLM y ST-FLA con ES, la población se vio disminuida respecto a estos ligandos en solitario. Por el contrario, la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, Pam3CSK4, ST-FLA con CE y FSL-1, la población CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁺ se incrementó. En el caso de CE en combinación con Pam3CSK4 el incremento fue estadísticamente significativo ($p=0,006$) (Figura 79).

De forma paralela, la expresión de las dos citocinas estudiadas también presentó cambios. Así, mientras que la expresión de TNF- α no se vio modificada ni por ES ni por CE en solitario respecto al control negativo, la IL-12 se vio disminuida por ES e incrementada por CE.

La estimulación con los ligandos de los TLR produjo un aumento en la expresión intracelular de ambas citocinas respecto al control negativo, excepto en el caso de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW, FSL-1 y ssARN 40, así como LPS *E. coli* K12 en el caso de IL-12, que presentaron el efecto contrario.

Tabla 55. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ TNF- α + en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ IL-12+ TNF- α + (%) | IL-12 (GMean) | TNF- α (GMean) |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Control | 1,3 \pm 0,7 | 77,3 \pm 15,4 | 14 \pm 8,7 |
| ES | 1,5 \pm 1 | 72,9 \pm 5,7 | 12,3 \pm 9,2 |
| CE | 1,7 \pm 1,5 | 81,4 \pm 18,2 | 12,2 \pm 7,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 8,4 \pm 1,6 | 86,4 \pm 15,6 | 17 \pm 13,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 7,6 \pm 0,7 | 85,1 \pm 6,2 | 16 \pm 11,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 8,8 \pm 0,3 | 89,5 \pm 5,2 | 15,8 \pm 11 |
| CpG (ODN1826) | 17,5 \pm 2,6 | 499,9 \pm 226,2 | 21 \pm 11,5 |
| CpG (ODN1826) +ES | 16,5 \pm 0,6 | 425,1 \pm 224,7 | 22,6 \pm 16,3 |
| CpG (ODN1826) +CE | 16,2 \pm 3 | 401,5 \pm 216 | 19,7 \pm 12,7 |
| Pam3CSK4 | 11,5 \pm 3,4 | 90,6 \pm 16,5 | 18,2 \pm 9,1 |
| Pam3CSK4+ES | 12,2 \pm 3 | 104,3 \pm 22,2 | 23 \pm 14,6 |
| Pam3CSK4+CE | 13,5 \pm 3,6 | 102,7 \pm 22,2 | 20,3 \pm 9,8 |
| HKLM | 12,4 \pm 2,5 | 117,5 \pm 26,5 | 21,2 \pm 7,1 |
| HKLM+ES | 11,4 \pm 3,4 | 135,1 \pm 47,8 | 25,8 \pm 15,7 |
| HKLM+CE | 7 \pm 8 | 90,9 \pm 17,2 | 24,2 \pm 17,2 |
| Poly (I:C) | 3 \pm 1,2 | 75,8 \pm 5,2 | 14,8 \pm 10,6 |
| Poly (I:C) +ES | 2,3 \pm 1,1 | 100,7 \pm 32,2 | 13,7 \pm 8,6 |
| Poly (I:C) +CE | 3 \pm 1 | 84,9 \pm 27,9 | 13,1 \pm 7,8 |
| Poly (I:C) LMW | 3 \pm 1,4 | 75 \pm 7,3 | 15,9 \pm 9,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 4 \pm 0,9 | 85,6 \pm 14,2 | 13,5 \pm 7,6 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 4,3 \pm 4,8 | 89,6 \pm 25,8 | 74,5 \pm 114,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 3,5 \pm 0,6 | 83,7 \pm 13,1 | 13,6 \pm 9,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 6,5 \pm 2,2 | 56,1 \pm 7 | 14,6 \pm 8,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 4,2 \pm 1 | 87,6 \pm 17,7 | 14,7 \pm 10,6 |
| ST-FLA | 3,7 \pm 2,7 | 92,4 \pm 21,1 | 56,9 \pm 79,9 |
| ST-FLA+ES | 3,2 \pm 3 | 134,9 \pm 69,3 | 57,6 \pm 82,2 |
| ST-FLA+CE | 4,8 \pm 6,6 | 148 \pm 85,6 | 47,2 \pm 62,9 |
| FSL-1 | 2,5 \pm 1,1 | 70,1 \pm 6,1 | 8,4 \pm 1,7 |
| FSL-1+ES | 3,1 \pm 1,1 | 72,5 \pm 4,6 | 8,6 \pm 1,4 |
| FSL-1+CE | 4,3 \pm 4,5 | 74,1 \pm 13,1 | 11,8 \pm 6,1 |
| ssARN 40 | 1,8 \pm 0,3 | 68,9 \pm 13,8 | 8,4 \pm 0,9 |
| ssARN 40+ES | 1,9 \pm 0,1 | 68,6 \pm 12,5 | 7,9 \pm 1,5 |
| ssARN 40+CE | 1,6 \pm 1,2 | 71 \pm 11,5 | 9,5 \pm 2,3 |

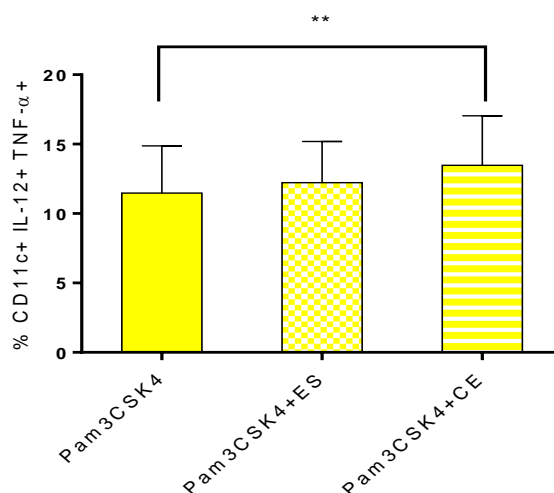


Figura 79. Resultado en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+ TNF- α así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con PAM3CSK4 respecto a PAM3CSK4 solo ($p=0,006$).

Por último, la asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR, dio lugar a un descenso en la expresión de la IL-12 en el caso de CpG (ODN1826), LPS *E. coli* K12 con ES y HKLM con CE, respecto a estos ligandos en solitario. En el caso de CpG (ODN1826) en combinación con ES o CE dicho descenso fue estadísticamente significativo respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,028$, $p=0,004$, respectivamente) (Figura 80).

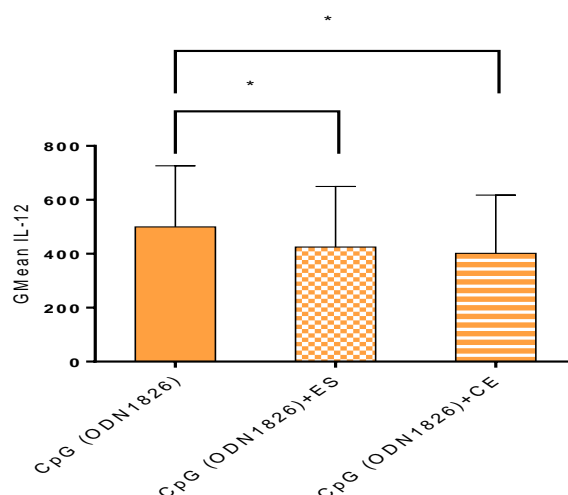


Figura 80. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo tanto en presencia de ES como de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,028$, $p=0,004$, respectivamente).

Además, la asociación de ES o CE con Pam3CSK4, HKLM con ES, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, dio lugar a un incremento en la expresión intracelular de IL-12 respecto a estos ligandos en solitario. En el caso concreto de Pam3CSK4 y Poly (I:C) LMW con CE, también se vio incrementada la expresión de TNF- α .

En segundo lugar, se analizaron los resultados obtenidos para la población CD11c+ IL-12- TNF- α +. La Tabla 56 muestra todos los resultados.

Tabla 56. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12- TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ IL-12- TNF- α (%) | TNF- α (GMean) |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Control | 2,9 \pm 1,5 | 16,8 \pm 9,7 |
| ES | 3 \pm 1,5 | 15,7 \pm 6,7 |
| CE | 3,1 \pm 1,6 | 16,7 \pm 13,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 4,2 \pm 0,7 | 17,1 \pm 11,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 4,1 \pm 1,1 | 18,8 \pm 14,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 4,4 \pm 1,6 | 17,4 \pm 11,4 |
| CpG (ODN1826) | 0,3 \pm 0,2 | 35,5 \pm 23,1 |
| CpG (ODN1826) +ES | 0,6 \pm 0,3 | 23,5 \pm 14,3 |
| CpG (ODN1826) +CE | 0,5 \pm 0,3 | 15,8 \pm 4,4 |
| Pam3CSK4 | 8,7 \pm 1,5 | 19,2 \pm 10,4 |
| Pam3CSK4+ES | 10,1 \pm 1,3 | 21,3 \pm 13,6 |
| Pam3CSK4+CE | 9,3 \pm 0,9 | 19,9 \pm 9,5 |
| HKLM | 9 \pm 1,4 | 23,4 \pm 11,7 |
| HKLM+ES | 11,1 \pm 3,7 | 23,8 \pm 18,7 |
| HKLM+CE | 6,9 \pm 1,3 | 21,8 \pm 16,6 |
| Poly (I:C) | 8 \pm 1,8 | 14,3 \pm 10,2 |
| Poly (I:C) +ES | 5 \pm 0,3 | 12,9 \pm 8,8 |
| Poly (I:C) +CE | 6,8 \pm 1,4 | 14,1 \pm 10,9 |
| Poly (I:C) LMW | 6,9 \pm 1,3 | 14,3 \pm 9 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 9,4 \pm 4,1 | 15,3 \pm 10,6 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 23,3 \pm 28,3 | 59,1 \pm 87,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 3,4 \pm 0,5 | 15 \pm 10,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 3,5 \pm 0,5 | 15,1 \pm 15 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 3,6 \pm 0,3 | 14 \pm 8 |
| ST-FLA | 21,6 \pm 28,6 | 57,2 \pm 77,9 |
| ST-FLA+ES | 20,6 \pm 29,6 | 42,3 \pm 52,7 |
| ST-FLA+CE | 18,4 \pm 27,2 | 42,6 \pm 47 |
| FSL-1 | 6,2 \pm 2,8 | 12,1 \pm 1,8 |
| FSL-1+ES | 6,1 \pm 1,9 | 11,5 \pm 1,6 |
| FSL-1+CE | 5,2 \pm 1,3 | 11 \pm 1,6 |
| ssARN 40 | 4,8 \pm 1,8 | 12,6 \pm 1,3 |
| ssARN 40+ES | 4,6 \pm 1,7 | 13 \pm 2,6 |
| ssARN 40+CE | 7 \pm 5,1 | 14,3 \pm 1,2 |

La presencia de ES o CE no dio lugar a cambios en la población CD11c+ IL-12- TNF- α respecto al control. Por el contrario, la estimulación con los ligandos de los TLR incrementó la población CD11c+ IL-12- TNF- α respecto al control, excepto en presencia de CpG (ODN1826), que la disminuyó.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c+ IL-12- TNF- α respecto a los ligandos en solitario para el caso

concreto de CpG (ODN1826), Pam3CSK4, HKLM con ES y Poly (I:C) LMW y ssARN 40 con CE. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,049$). Por el contrario, la asociación de ES o CE con Poly (I:C), ST-FLA y de HKLM con CE dio lugar a un descenso de la población CD11c+ IL-12- TNF- α + respecto a los ligandos en solitario. En el caso de CE en combinación con HKLM dicho descenso fue estadísticamente significativo ($p=0,013$) (Figura 81).

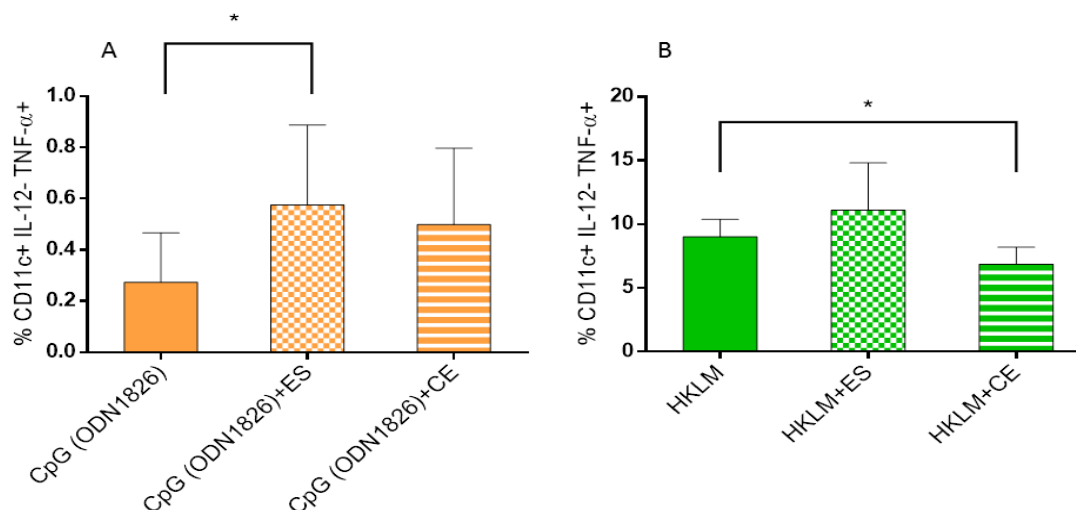


Figura 81. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12- TNF- α + así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,049$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12- TNF- α + así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,013$).

En cuanto a la expresión de TNF- α en la población CD11c+ IL-12- TNF- α +, la presencia de ES o CE en solitario no ocasionó cambio alguno respecto al control sin estimular. Además, la estimulación con los ligandos de los TLR tampoco ocasionó grandes modificaciones, con la excepción de CpG (ODN1826), HKLM y ST-FLA que la incrementaron, y de FSL-1 y ssARN 40, que la disminuyeron respecto al control negativo.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR tampoco modificó en gran medida la expresión de esta citocina respecto a los ligandos en solitario. Tan solo en el caso de CpG (ODN1826) y ST-FLA se vio disminuida respecto a estos ligandos en solitario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por último, se analizaron los datos obtenidos de la población CD11c+ IL-12+ TNF- α -. En la Tabla 57 se muestran los resultados obtenidos.

Como se puede observar, la presencia de ES o CE incrementó la población CD11c+ IL-12+ TNF- α - respecto al control. Así mismo, la estimulación con los ligandos de los TLR también aumentó esa población TNF- α -, excepto en presencia de ST-FLA y ssARN 40, que no la modificaron.

Tabla 57. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ TNF- α - en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ IL-12+ TNF- α - (%) | IL-12 (GMean) |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Control | 6,1 \pm 2,9 | 55,5 \pm 9 |
| ES | 6,9 \pm 4 | 55,4 \pm 8,3 |
| CE | 7,4 \pm 2,2 | 56,4 \pm 5,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 56 \pm 13,4 | 106,4 \pm 25,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 55,7 \pm 11,8 | 96,4 \pm 21,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 53,8 \pm 11,6 | 97,3 \pm 20,9 |
| CpG (ODN1826) | 78,8 \pm 1,1 | 317,4 \pm 143,4 |
| CpG (ODN1826) +ES | 77,7 \pm 3,9 | 290,4 \pm 146,3 |
| CpG (ODN1826) +CE | 78,6 \pm 1,9 | 288,7 \pm 143 |
| Pam3CSK4 | 30,6 \pm 2,2 | 79,5 \pm 16,3 |
| Pam3CSK4+ES | 26,8 \pm 5,7 | 87,3 \pm 24 |
| Pam3CSK4+CE | 27,5 \pm 1,9 | 80,2 \pm 15,9 |
| HKLM | 24,3 \pm 2,3 | 65,4 \pm 9,4 |
| HKLM+ES | 17,7 \pm 10,4 | 75,1 \pm 20,3 |
| HKLM+CE | 15,3 \pm 18,1 | 65,6 \pm 14,2 |
| Poly (I:C) | 12,5 \pm 1,1 | 63,2 \pm 15,7 |
| Poly (I:C) +ES | 11,3 \pm 2,4 | 76,1 \pm 29,1 |
| Poly (I:C) +CE | 8 \pm 3,3 | 57 \pm 10,4 |
| Poly (I:C) LMW | 12,5 \pm 8,7 | 71,6 \pm 24,5 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 15,2 \pm 2,8 | 74,9 \pm 22 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 5,6 \pm 4,7 | 69,1 \pm 21,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 44,1 \pm 8,7 | 84,2 \pm 22,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 13,5 \pm 20,8 | 68 \pm 7,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 45,4 \pm 7,6 | 82 \pm 20,1 |
| ST-FLA | 5,5 \pm 4,5 | 65,1 \pm 12,9 |
| ST-FLA+ES | 6,2 \pm 5,1 | 108,9 \pm 70,9 |
| ST-FLA+CE | 2,5 \pm 2 | 67,4 \pm 27,2 |
| FSL-1 | 14,3 \pm 2,9 | 60,4 \pm 1,9 |
| FSL-1+ES | 16,7 \pm 2,9 | 61,2 \pm 4,3 |
| FSL-1+CE | 11,6 \pm 8,7 | 61,7 \pm 4,6 |
| ssARN 40 | 7,7 \pm 3,6 | 52,2 \pm 2,4 |
| ssARN 40+ES | 6,3 \pm 2,5 | 53,4 \pm 2 |
| ssARN 40+CE | 8 \pm 2,2 | 51,9 \pm 6,6 |

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un descenso en el porcentaje de células CD11c+ IL-12+ TNF- α - respecto a los ligandos en solitario para CpG (ODN1826) con ES, LPS *E. coli* K12 con ES, Pam3CSK4 o HKLM o Poly (I:C) o Poly (I:C) LMW con CE, ST-FLA con CE y FSL-1 con CE. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Respecto a la expresión intracelular de IL-12 en la población CD11c+ IL-12+ TNF- α -, la presencia de ES o CE no la modificaron respecto al control, mientras que la estimulación con los ligandos de los TLR la aumentaron excepto para ssARN 40, que no la modificó. Por

su parte, la asociación con ES o CE de los ligandos de los TLR dio lugar a un descenso en la expresión intracelular de la IL-12 en la población CD11c+ IL-12+ TNF- α - para el caso de LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826) o LPS *E. coli* K12 con ES y de Poly (I:C) con ES respecto a los ligandos en solitario. Por el contrario, la asociación de ES con Pam3CSK4, HKLM, Poly (I:C) y ST-FLA presentó el efecto contrario.

La disminución en la expresión intracelular de IL-12 en la población CD11c+ IL-12+ TNF- α - fue estadísticamente significativa para ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,028$) (Figura 82).

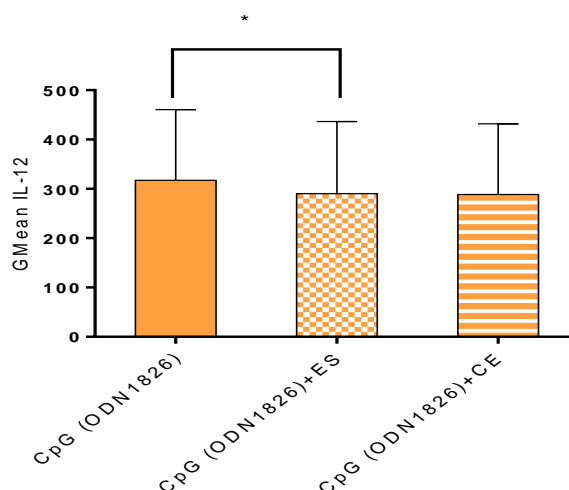


Figura 82. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c+ IL-12+ TNF- α - así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo tanto en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,028$).

2.1.11. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre el factor de transcripción Myd88

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ Myd88+ en función de los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, respecto al control, así como su interacción con los distintos ligandos de los TLR ensayados.

La expresión intracelular del factor de transcripción Myd88 se testó tras 12 h de estimulación. Además, se incluyeron los datos obtenidos al estimular con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6, además del resto que se venían ensayando hasta ahora. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 58.

Tabla 58. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ Myd88+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | Myd88 (%) | Myd88 (GMean) |
|------------------------------------|------------------|------------------|
| Control | 78,8±23,7 | 43,7±12,4 |
| ES | 71,9±24,4 | 37,1±11,2 |
| CE | 72,9±27,9 | 44,4±18,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 75,8±18,5 | 33,1±12,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 67,9±23,5 | 34,2±18,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 70,8±19,7 | 32,5±15,2 |
| CpG (ODN1826) | 56,5±26,3 | 31,7±16 |
| CpG (ODN1826) +ES | 62,1±23,8 | 29,3±7,9 |
| CpG (ODN1826) +CE | 71,8±27,6 | 30,3±6 |
| Pam3CSK4 | 53,5±53,4 | 31,1±9,8 |
| Pam3CSK4+ES | 52,9±46,2 | 31,7±11,5 |
| Pam3CSK4+CE | 49,9±51 | 29,6±6,1 |
| HKLM | 48,2±57,4 | 35,6±12 |
| HKLM+ES | 12,3±43,5 | 25,9±32,3 |
| HKLM+CE | 51±43,7 | 29±6,1 |
| Poly (I:C) | 80,7±18,3 | 35±8,1 |
| Poly (I:C) +ES | 80,1±16,9 | 33,9±9,7 |
| Poly (I:C) +CE | 73,1±19,9 | 31,3±6,2 |
| Poly (I:C) LMW | 70,5±20,7 | 30,4±8,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 77,1±28,7 | 43±21,3 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 45±4,9 | 29,5±6,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 63±44,1 | 28,1±7,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 59,8±49 | 31,6±9,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 72±28,3 | 29,2±6,3 |
| ST-FLA | 56,8±16,8 | 32,6±12,2 |
| ST-FLA+ES | 46,1±23,5 | 27,3±3,8 |
| ST-FLA+CE | 49,8±13 | 28,3±7,2 |
| FSL-1 | 84,1±2,7 | - |
| FSL-1+ES | 90,4±3,1 | - |
| FSL-1+CE | 91,6±1,8 | - |
| ssARN 40 | 93,5±2,1 | 59,3±3,4 |
| ssARN 40+ES | 91,4±1,4 | 53,5±5,1 |
| ssARN 40+CE | 84,7±4,2 | 36,8±5,4 |

La población CD11c+ Myd88+ se vio disminuida por la presencia de ES o CE respecto al control, así como por cada uno de los ligandos de los TLR, con la única excepción de ssARN 40 que la incrementó.

El descenso respecto al control de la población CD11c+ Myd88+ en presencia de ES en solitario fue estadísticamente significativo ($p=0,012$) (Figura 83).

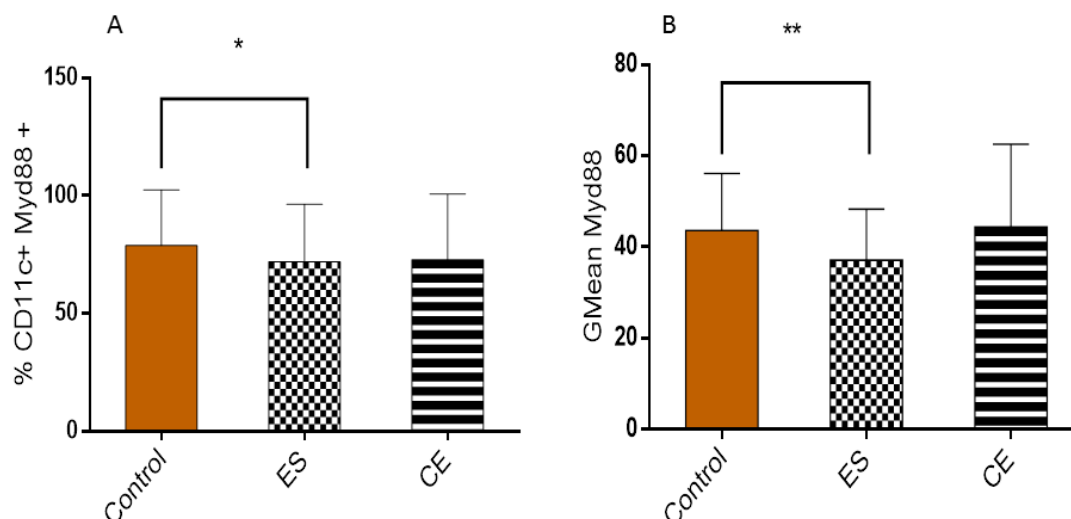


Figura 83. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES solo respecto al control ($p=0,012$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de ES solo respecto al control ($p=0,006$).

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó un incremento de las células CD11c+ Myd88+ respecto a los ligandos en solitario para los casos: CpG (ODN1826) o LPS *E. coli K12* en combinación con CE, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW con ES y FSL-1 con ES y CE. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por el contrario, la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6, HKLM con ES, Poly (I:C) con ES, Poly (I:C) LMW con CE y de ST-FLA y ssARN 40 con ES o CE tuvo el efecto contrario. En el caso de ES y CE en combinación con ssARN 40 el descenso de la población CD11c+ Myd88+ respecto a ssARN 40 solo, fue estadísticamente significativo en ambos casos ($p=0,049$, $p=0,02$, respectivamente) (Figura 84).

Por otra parte, la expresión intracelular de Myd88 en células CD11c+ se vio disminuida por ES respecto al control, siendo estadísticamente significativo ($p=0,006$) (Figura 83). La estimulación con CE en solitario no dio lugar a cambios en la expresión de Myd88 respecto al control. Así mismo, la estimulación con los ligandos de TLR ocasionaron un descenso en la expresión intracelular de Myd88, excepto en el caso de ssARN 40 que la incrementó.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos no dio lugar a cambios en la expresión de Myd88 respecto a los ligandos en solitario. Solo en los casos de Pam3CSK4 con ES, HKLM con ES/CE y ssARN 40 con ES/CE se originó un descenso en la expresión intracelular de Myd88. Dicho descenso fue estadísticamente significativo en el caso de CE ($p=0,004$) y cercano a la significancia para ES en combinación con ssARN 40 respecto a solo ssARN 40 ($p=0,05$) (Figura 84).

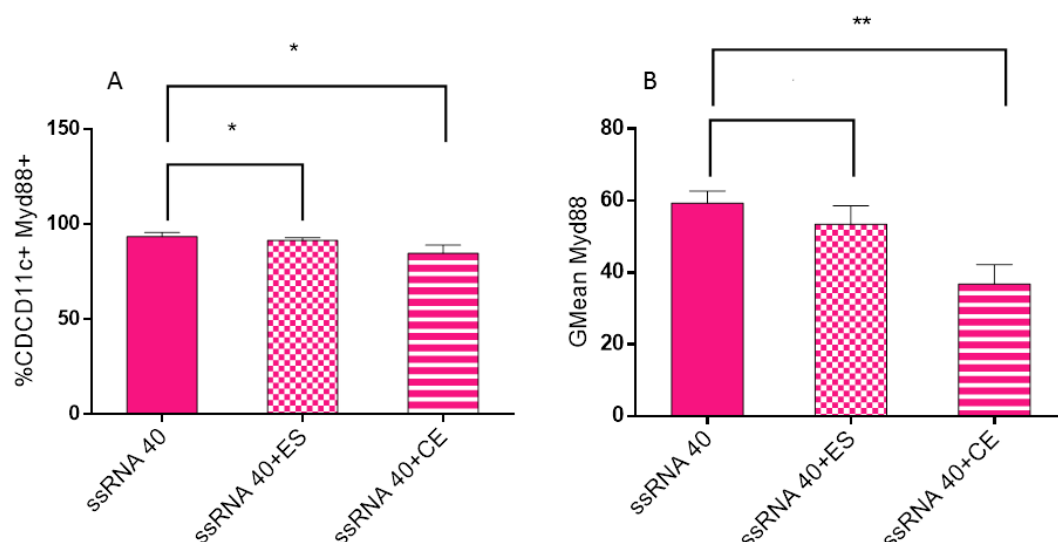


Figura 84. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con ssARN 40 respecto a solo ssARN 40 ($p=0,049$, $p=0,02$, respectivamente). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo al asociar CE con ssARN 40 ($p=0,004$), y cercano a la significancia al combinar ssARN 40 con ES respecto a ssARN 40 en solitario ($p=0,05$).

En segundo lugar, se analizó la población CD11c- Myd88+. Los resultados se muestran en la Tabla 59.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c- Myd88+ se vio disminuida por la presencia de ES respecto al control, mientras que CE no dio lugar a cambio alguno. La estimulación con los ligandos de los TLR en solitario originó igualmente un descenso de dicha población, con la excepción de FSL-1 y ssARN 40, que la incrementaron respecto al control.

El descenso de la población CD11c- Myd88+ en presencia de ES en solitario fue estadísticamente significativo respecto al control ($p=0,009$) (Figura 85). La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó un descenso casi generalizado de las células CD11c+ Myd88+ respecto a los ligandos en solitario. Tan solo en el caso de LPS *E. coli* K12, CpG (ODN1826) y Poly (I:C) LMW con ES se observó el efecto contrario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 59. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- Myd88+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | Myd88 (%) | Myd88 (GMean) |
|------------------------------------|------------------|-----------------|
| Control | 37,3±22,5 | 25±6,4 |
| ES | 28,6±20,7 | 21,5±4,1 |
| CE | 32,1±24,7 | 24,1±6,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 26,7±20,9 | 21,9±6,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 22,8±25,1 | 23,1±10,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 21,4±24,3 | 22,3±10 |
| CpG (ODN1826) | 19,7±23,7 | 23±8,6 |
| CpG (ODN1826) +ES | 20±20,1 | 22,4±7,1 |
| CpG (ODN1826) +CE | 25,7±18,8 | 21,2±3,2 |
| Pam3CSK4 | 28±37,7 | 22,5±6,3 |
| Pam3CSK4+ES | 25,1±33,8 | 22,6±8,6 |
| Pam3CSK4+CE | 21,6±29,7 | 20,9±5,5 |
| HKLM | 28,4±39,5 | 23,4±9,8 |
| HKLM+ES | 22,1±25,3 | 18,3±12,5 |
| HKLM+CE | 22,2±29,7 | 21,2±5,5 |
| Poly (I:C) | 36,5±22,8 | 23±5,9 |
| Poly (I:C) +ES | 33,7±21,6 | 22,6±5,5 |
| Poly (I:C) +CE | 30,2±19,2 | 21,1±3 |
| Poly (I:C) LMW | 24,2±22,3 | 20,1±3,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 31,8±30,6 | 23±6,3 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 8,8±9,1 | 19,1±2,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 23,5±29 | 19,8±4,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 25,9±32,9 | 22±4,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 27,6±24,9 | 22,8±4,7 |
| ST-FLA | 13,7±11,5 | 18,9±1,3 |
| ST-FLA+ES | 10,4±10,5 | 18,4±0,9 |
| ST-FLA+CE | 9,7±6,6 | 18,5±1,3 |
| FSL-1 | 53,4±3,2 | 22,2±18,3 |
| FSL-1+ES | 35,9±24,6 | 21,7±16,4 |
| FSL-1+CE | 42,9±23,4 | 26±19,9 |
| ssARN 40 | 53,4±3,2 | 28,6±4,2 |
| ssARN 40+ES | 52,2±5,4 | 26,4±5 |
| ssARN 40+CE | 35,2±20,7 | 24,1±15,3 |

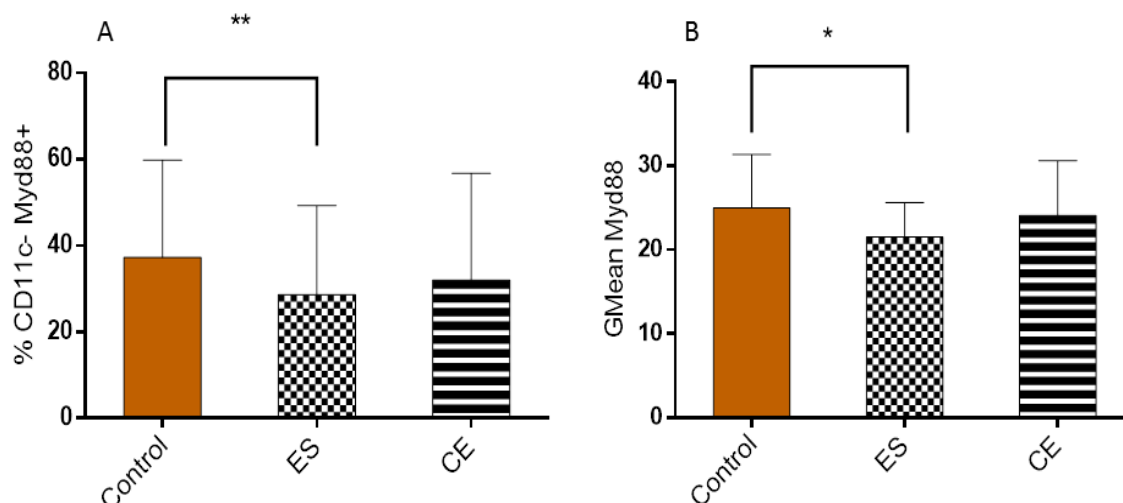


Figura 85. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- Myd88+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,009$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de solo ES respecto al control ($p=0,048$).

En cuanto a los cambios producidos en la expresión intracelular de Myd88 en células CD11c-, la estimulación con ES la disminuyó, mientras que CE no dio lugar a cambios respecto al control. El descenso observado en la expresión intracelular de Myd88 fue estadísticamente significativo respecto al control ($p=0,048$) (Figura 85). Por su parte, la estimulación con los ligandos de TLR en solitario mostró una tendencia generalizada hacia el descenso en la expresión de Myd88 respecto al control.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos no dio lugar a cambios en la expresión de Myd88 respecto a los ligandos en solitario. Solo en el caso de HKLM con ES y CE; Poly (I:C) LMW con CE y ssARN 40 con ES y CE, se originó un descenso en la expresión intracelular de Myd88. Por el contrario, la asociación tanto de ES como de CE con LPS *E. coli* K12 dio lugar a un incremento en la expresión intracelular de Myd88 que fue estadísticamente significativo respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario ($p=0,019$ y $p=0,031$, respectivamente) (Figura 86).

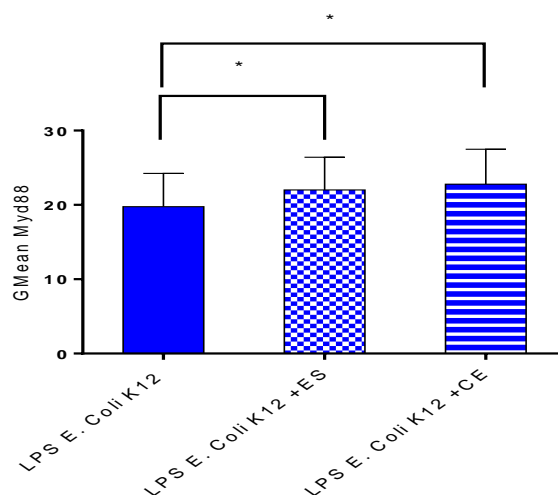


Figura 86. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a solo LPS *E. coli* K12 ($p=0,019$, $p=0,031$, respectivamente).

2.1.12. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre el factor de transcripción NF- κ B

En primer lugar, se analizó respecto al control la población CD11c+ NF- κ B+ en función de los antígenos larvarios de *A. simplex* ES y CE, así como su interacción con los distintos ligandos de los TLR ensayados.

La expresión intracelular del factor de transcripción NF- κ B se testó tras 12 h de estimulación. Además, se incluyeron los datos obtenidos al estimular con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6, además del resto que se venían ensayando hasta ahora. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 60.

Como se puede observar, la presencia de ES disminuyó la población CD11c+ NF- κ B+ respecto al control, mientras que CE no dio lugar a cambios. La estimulación con los ligandos de los TLR aumentó dicha población respecto al control, con las excepciones de Pam3CSK4, HKLM, LPS *E. coli* K12, FSL-1 y ssARN 40, que la disminuyeron.

Por su parte, la asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c+ NF- κ B+ respecto a los ligandos en solitario en los siguientes casos: LPS *E. coli* 026B6, CpG (ODN1826), LPS *E. coli* K12, Pam3CSK4 con ES, HKLM con CE y Poly (I:C) LMW y ssARN 40 con ES. En el caso de CE en combinación con CpG (ODN1826) el incremento fue estadísticamente significativo respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,037$) (Figura 87).

Tabla 60. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ NF- κ B + en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | NF- κ B (%) | NF- κ B (GMean) |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Control | 40,3 \pm 16,7 | 71,7 \pm 26,1 |
| ES | 36,7 \pm 21 | 71 \pm 25,8 |
| CE | 38,2 \pm 23,4 | 89 \pm 60,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 65,9 \pm 12,7 | 93,2 \pm 26,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 74,1 \pm 5,6 | 94,6 \pm 27,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 67,3 \pm 11,4 | 80,1\pm16,8 |
| CpG (ODN1826) | 61,9 \pm 18,2 | 80,2 \pm 16 |
| CpG (ODN1826) +ES | 72,4 \pm 15,6 | 82,8 \pm 18,7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 69,9\pm19,5 | 87,9 \pm 27,5 |
| Pam3CSK4 | 22 \pm 21 | 87,6 \pm 39,7 |
| Pam3CSK4+ES | 26,4 \pm 19,6 | 74,1 \pm 25,9 |
| Pam3CSK4+CE | 23,7 \pm 24,5 | 88,3 \pm 46,4 |
| HKLM | 13,9 \pm 1,4 | 106,6 \pm 6,4 |
| HKLM+ES | 8,4 \pm 1,4 | 67 \pm 17 |
| HKLM+CE | 18,8 \pm 19,6 | 118,2 \pm 87,3 |
| Poly (I:C) | 58,1 \pm 34,2 | 97,9 \pm 15,2 |
| Poly (I:C) +ES | 56,2 \pm 32,5 | 95,8 \pm 20,5 |
| Poly (I:C) +CE | 40,2 \pm 38,5 | 103,2 \pm 52,4 |
| Poly (I:C) LMW | 57 \pm 25,7 | 89,2 \pm 19,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 60,8 \pm 17,8 | 97,8 \pm 31,5 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 61,8 \pm 24,8 | 76 \pm 9,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 31,8 \pm 33,8 | 73,6 \pm 22,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 45,8 \pm 25,5 | 71,5 \pm 17,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 33 \pm 5,2 | 62,3 \pm 2 |
| ST-FLA | 59,9 \pm 21,7 | 78,4 \pm 9,9 |
| ST-FLA+ES | 56,9 \pm 21,4 | 79,6 \pm 7,1 |
| ST-FLA+CE | 60 \pm 10,2 | 71,3 \pm 19,3 |
| FSL-1 | 40,2 \pm 8,7 | 49,2 \pm 4,1 |
| FSL-1+ES | 37,9 \pm 10 | 46,6 \pm 4,9 |
| FSL-1+CE | 40,5 \pm 7,1 | 47,1\pm4 |
| ssARN 40 | 33,5 \pm 6,9 | 49,7 \pm 4,8 |
| ssARN 40+ES | 35,6 \pm 9,3 | 53,4 \pm 6 |
| ssARN 40+CE | 29,1 \pm 4,7 | 49,6 \pm 1,6 |

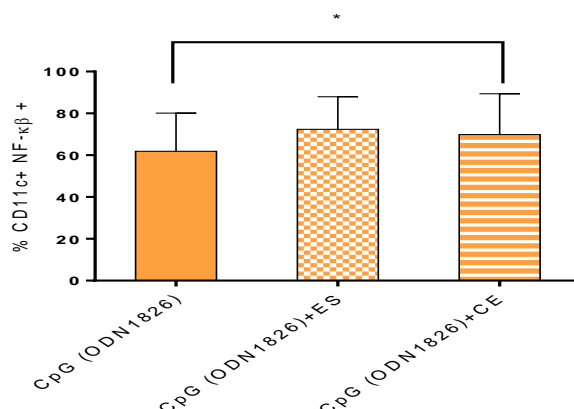


Figura 87. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ NF-κβ+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,037$).

En cuanto a lo que se refiere a la expresión intracelular de NF-κβ en la población CD11c+ NF-κβ+, la presencia de ES no la modificó mientras que CE la aumentó respecto al control. La estimulación con los ligandos de los TLR la aumentaron en todos los casos excepto para FSL-1 y ssARN 40 que la disminuyeron.

La asociación con ES o CE de los ligandos de los TLR dio lugar a un descenso en la expresión intracelular de NF-κβ en dicha población en el caso de LPS *E. coli* 026B6 con CE, LPS *E. coli* K12 con CE, Pam3CSK4 con ES, HKLM con ES, Poly (I:C) LMW con CE, ST-FLA con CE y FSL-1 con ambos. Dicho descenso fue estadísticamente significativo para CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario ($p=0,036$), y para CE en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,025$) (Figura 88). En el resto de combinaciones la expresión intracelular de NF-κβ se mantuvo más o menos similar al ligando correspondiente en solitario, o mostró cierto incremento, como es el caso de CpG (ODN1826).

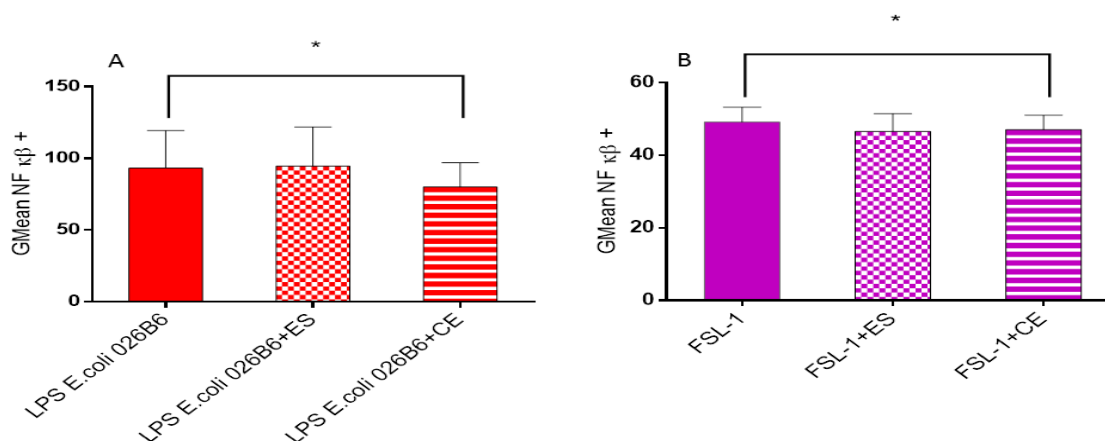


Figura 88. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción NF-κβ en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de NF-κβ fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,036$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción NF-κβ en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de NF-κβ fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,025$).

En segundo lugar, se analizó la población CD11c- NF- κ B+. Los resultados se muestran en la Tabla 61.

Tabla 61. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- NF- κ B + en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | NF- κ B (%) | NF- κ B (GMean) |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Control | 8 \pm 4,9 | 43,5 \pm 9,8 |
| ES | 7 \pm 6,5 | 43,4 \pm 8,7 |
| CE | 7,4 \pm 5,7 | 44,1 \pm 11,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 21,3 \pm 7,5 | 63 \pm 10,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 24,4 \pm 8,6 | 63,5 \pm 11,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 19,3 \pm 8,1 | 57,8 \pm 5,9 |
| CpG (ODN1826) | 15 \pm 5,5 | 56,6 \pm 7,8 |
| CpG (ODN1826) +ES | 21,6 \pm 8,2 | 59 \pm 10,5 |
| CpG (ODN1826) +CE | 20,3 \pm 8,1 | 58,8 \pm 8,5 |
| Pam3CSK4 | 5,2 \pm 6,7 | 51 \pm 4,4 |
| Pam3CSK4+ES | 5,9 \pm 7,5 | 44,9 \pm 1,8 |
| Pam3CSK4+CE | 7,3 \pm 10,2 | 51,6 \pm 9 |
| HKLM | 1,1 \pm 0,3 | 47,7 \pm 3,2 |
| HKLM+ES | 1,4 \pm 1 | 44,6 \pm 2,5 |
| HKLM+CE | 6,9 \pm 9,2 | 54,5 \pm 12,8 |
| Poly (I:C) | 16,4 \pm 12,1 | 57,7 \pm 6,1 |
| Poly (I:C) +ES | 15,2 \pm 13,5 | 60,7 \pm 6,5 |
| Poly (I:C) +CE | 13,5 \pm 19,8 | 58,9 \pm 16,2 |
| Poly (I:C) LMW | 13,8 \pm 6,8 | 52,7 \pm 6 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 11,7 \pm 7,5 | 52,2 \pm 7 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 20,5 \pm 3,1 | 56,5 \pm 6,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 13,3 \pm 18,4 | 47,3 \pm 3,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 12,5 \pm 1,4 | 52,5 \pm 5,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 7,7 \pm 6,6 | 50,7 \pm 8,1 |
| ST-FLA | 19,4 \pm 5,4 | 56 \pm 8,3 |
| ST-FLA+ES | 17,7 \pm 2 | 57,3 \pm 5,6 |
| ST-FLA+CE | 14 \pm 5,3 | 53,3 \pm 7,1 |
| FSL-1 | 5,4 \pm 2,8 | 34,1 \pm 3,6 |
| FSL-1+ES | 4,3 \pm 2,9 | 32,7 \pm 4,1 |
| FSL-1+CE | 5,1 \pm 1,7 | 33,8 \pm 2 |
| ssARN 40 | 4,9 \pm 3,6 | 32,5 \pm 1,8 |
| ssARN 40+ES | 2,9 \pm 1,9 | 33,7 \pm 1,4 |
| ssARN 40+CE | 4,9 \pm 13,4 | 34,7 \pm 0,8 |

La presencia de ES y CE en solitario no originó cambios en la población CD11c- NF- κ B+ respecto al control, mientras que la estimulación con los ligandos de los TLR aumentó dicha población, con la excepción de Pam3CSK4, HKLM, FSL-1 y ssARN 40 que la disminuyeron.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c- NF- κ B+ respecto a los ligandos en solitario en los siguientes

casos: LPS *E. coli* 026B6 con ES, CpG (ODN1826), Pam3CSK4, HKLM con CE y Poly (I:C) LMW con CE. Presentó el efecto contrario la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 con CE, LPS *E. coli* K12 con CE, Poly (I:C) con CE, ST-FLA y ssARN 40 con CE y FSL-1 con ES. En el caso de ES en combinación con FSL-1 el descenso en la población CD11c- NF- κ B+ fue estadísticamente significativo respecto a FSL-1 en solitario ($p=0,002$) (Figura 89).

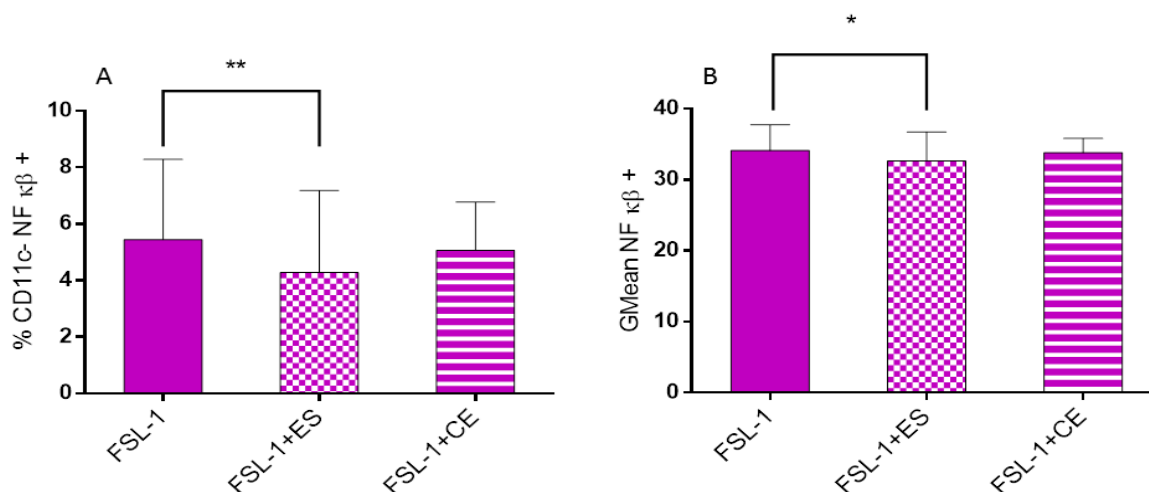


Figura 89. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- NF- κ B+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,002$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción NF- κ B en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de NF- κ B fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,034$).

Finalmente, la expresión intracelular de NF- κ B en la población CD11c- NF- κ B+, no fue modificada respecto al control por la presencia de ES o de CE, mientras que la estimulación con los ligandos de los TLR la aumentaron en todos los casos, excepto para FSL-1 y ssARN 40, que la disminuyeron.

La asociación con ES o CE de los ligandos de los TLR no dio lugar, en general, a grandes cambios respecto a los ligandos en solitario, salvo en el caso de LPS *E. coli* K12 con ES o CE, que se observó un incremento en la expresión respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario, y un descenso en el caso de FSL-1 con ES y CE respecto a solo FSL1.

El descenso en la expresión de NF- κ B en la población CD11c- NF- κ B+ fue estadísticamente significativo para ES en combinación con FSL-1 respecto a FSL-1 en solitario ($p=0,034$) (Figura 89).

2.2. Efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la señalización celular en células dendríticas de médula ósea de ratones C57BL/6

Las BMDDCs fueron estimuladas a día 6 de maduración durante 24 h para el estudio de las moléculas de superficie (CD80, CD86, MHC I, MHC II), durante 12 h en el caso de las citocinas (IL-10, IL-12, TNF- α), y también durante 12 h para el estudio de los factores de transcripción (Myd88 y NF- κ B).

Las células se estimularon con ES o CE en solitario, así como con los agonistas de los TLR individualmente y en combinación de aquellos con cada uno de estos últimos, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. En el caso de los ratones C57BL/6, el ligando ssARN 40, agonista de TLR7, y el ligando FSL-1, agonista de TLR6/2, no se testaron.

Los resultados obtenidos en ratones C57BL/6 se recogen a continuación.

2.2.1. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión de la molécula de superficie CD11c

En primer lugar, se analizó el efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre la expresión de la molécula de superficie CD11c⁺ respecto al control sin estimular, así como respecto a los ligandos de TLR tras 24 h de estimulación. En la Tabla 62 se muestran los resultados obtenidos.

Como se puede observar, tanto ES como CE en solitario originaron un descenso de la población CD11c⁺ respecto al control sin estimular.

Ahora bien, al asociar ES o CE con los ligandos de los TLR, en la mayoría de los casos dicha asociación favoreció un descenso en la población CD11c⁺ respecto al ligando en solitario. Las únicas excepciones fueron Pam3CSK4 con ES y CE, así como LPS *E. coli* K12 con CE.

Tabla 62. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c⁺ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c (%) | CD11c (GMean) |
|---------------------------|-----------|---------------|
| Control | 47,8±12,7 | 68,8±19,7 |
| ES | 42,7±12,6 | 55,8±12 |
| CE | 46,3±13,1 | 61,6±13,8 |
| Pam3CSK4 | 57,6±4,1 | 74,3±3,9 |
| Pam3CSK4+ES | 60±5,9 | 70,4±12,3 |
| Pam3CSK4+CE | 57,1±4,2 | 69,4±0,6 |
| HKLM | 61,2±2 | 73,7±3,8 |
| HKLM+ES | 58,7±2,9 | 66,8±6,8 |
| HKLM+CE | 57,5±2 | 65,2±5,3 |
| Poly (I:C) | 41,9±13,2 | 57,9±17,3 |
| Poly (I:C) +ES | 41,4±12,2 | 56,5±14,5 |
| Poly (I:C) +CE | 31,4±2,2 | 50,6±12,4 |
| Poly (I:C) LMW | 36,3±3,8 | 58,6±12,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 34,7±6,4 | 50,6±19,5 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 35,2±4,4 | 51,7±17,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 52,6±7,8 | 65,6±5,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 49±7,8 | 55,2±3,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 48,1±11,6 | 57,6±9,1 |
| ST-FLA | 36,1±3,3 | 48,8±12 |
| ST-FLA+ES | 35,9±8,3 | 51,7±15,1 |
| ST-FLA+CE | 31,7±4,4 | 46,8±12,1 |

El descenso en la población CD11c⁺ fue estadísticamente significativo para CE en combinación con HKLM respecto a HKLM individualmente ($p=0,001$), así como para ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a solo LPS *E. coli* K12 ($p=0,002$) (Figura 90).

En cuanto a la expresión de la molécula de superficie CD11c⁺, siguió aproximadamente un patrón similar al de la población CD11c⁺, como se puede apreciar en la. Además, el descenso en la expresión de CD11c⁺ bajo la estimulación de ES fue estadísticamente significativo respecto al control ($p=0,038$) (Figura 90).

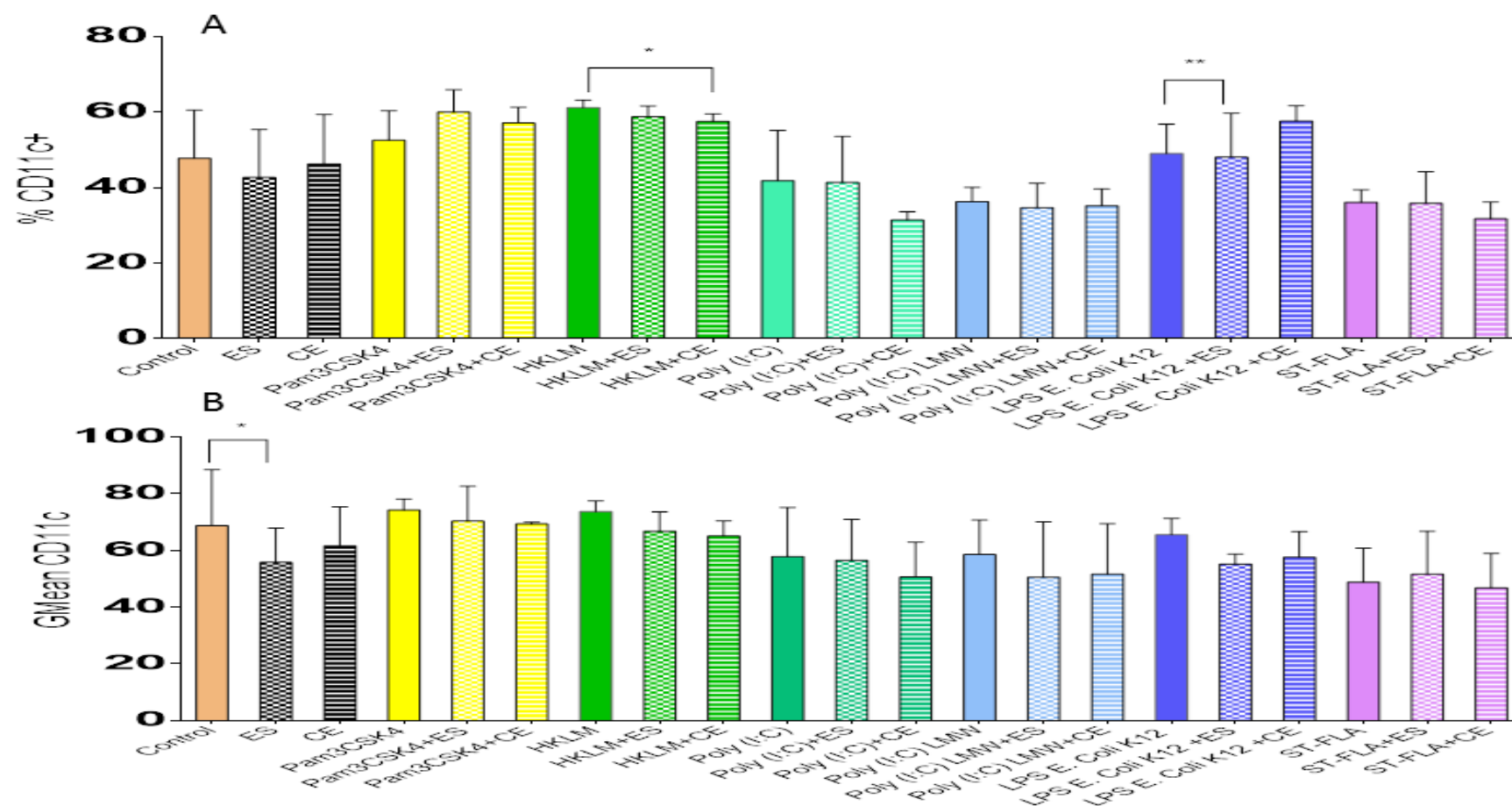


Figura 90. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,001$), y en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,002$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de CD11c fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,038$).

2.2.2. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión de la molécula coestimuladora CD80

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ CD80+ en función del efecto de los antígenos larvarios de *A. simplex*. En la Tabla 63 se muestran los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación.

Tabla 63. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ CD80+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) |
|---------------------------|-----------|--------------|
| Control | 51,3±22 | 53,7±17,6 |
| ES | 58±17,2 | 51,3±13,2 |
| CE | 55,1±20,5 | 53,8±17,9 |
| Pam3CSK4 | 64,2±11,5 | 93,2±19,9 |
| Pam3CSK4+ES | 68,5±7,7 | 96,1±19,6 |
| Pam3CSK4+CE | 72,2±5,7 | 93,7±17,3 |
| HKLM | 60,6±6,8 | 83,5±19 |
| HKLM+ES | 64±11,1 | 87,8±27,6 |
| HKLM+CE | 66,9±1,7 | 88,2±6,1 |
| Poly (I:C) | 51,1±23,7 | 58,5±18,1 |
| Poly (I:C) +ES | 50,2±21,8 | 58,1±19,1 |
| Poly (I:C) +CE | 49,5±21,4 | 55,5±21,4 |
| Poly (I:C) LMW | 49,5±26,4 | 42,5±19,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 44,4±21,6 | 41,5±20,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 43,2±29,6 | 40,1±18,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 74,8±5,4 | 106,6±11,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 77,4±5,2 | 110,2±11,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 75,7±7,8 | 104,7±12,1 |
| ST-FLA | 53,8±27,2 | 41,4±22,4 |
| ST-FLA+ES | 47,3±24,7 | 39,9±18,6 |
| ST-FLA+CE | 44,8±26,9 | 41,5±18,3 |

En general, la presencia de los ligandos por sí solos dio lugar a un aumento de la población CD11c+ CD80+ respecto al control, a excepción de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la disminuyeron.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR originó un incremento de la CD11c+ CD80+ respecto a los ligandos en solitario, excepto al asociarlos con Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la disminuyeron. El incremento en la población CD11c+ CD80+ para ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario fue estadísticamente significativo ($p=0,043$) (Figura 91).

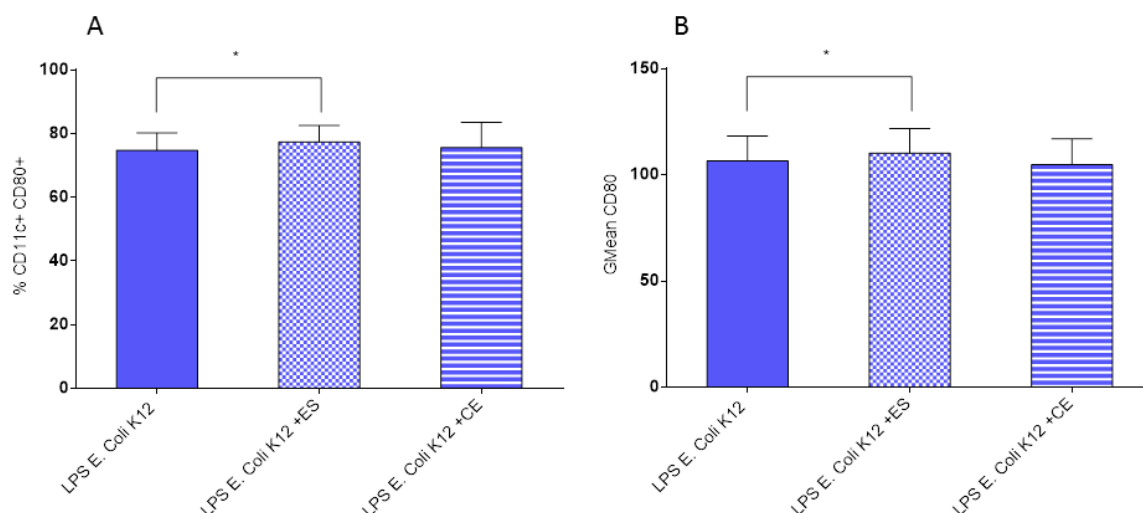


Figura 91. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,043$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80+ en células CD11c+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de CD80 fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,04$)

En cuanto a la expresión de CD80 en las células CD11c+, esta no se vio modificada por la presencia CE respecto al control sin estimular, mientras que ES dio lugar a un descenso respecto al control sin estimular, que fue estadísticamente significativo ($p=0,028$) (Figura 42). Así mismo, la estimulación con los ligandos de los TLR en solitario originó en todos los casos un incremento respecto al control, excepto para Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la disminuyeron.

Al asociar ES o CE con los ligandos de los TLR, la expresión de CD80 no presentó modificaciones respecto a los ligandos en solitario, salvo en el caso de HKLM y LPS *E. coli* K12 que se vio incrementada, así como al asociar ES o CE con Poly (I:C) LMW que en este caso presentó el efecto contrario. El incremento en la expresión de CD80 en la población CD11c+ CD80+ fue estadísticamente significativo en el caso de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario ($p=0,04$) (Figura 91). El descenso en la expresión de CD80 en la población CD11c+ CD80+ fue estadísticamente significativo en el caso de CE en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW en solitario ($p=0,019$) (Figura 92).

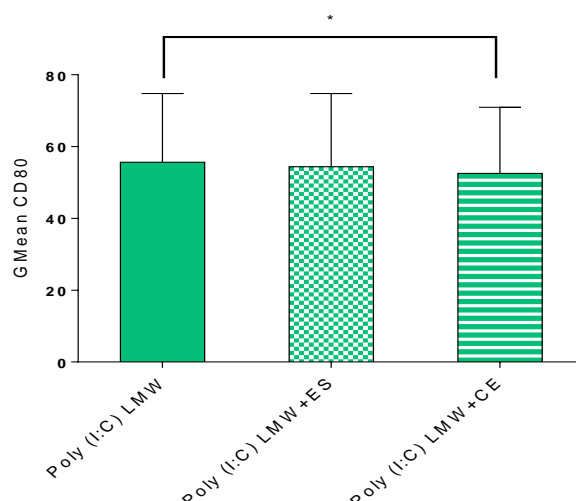


Figura 92. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80+ en células CD11c+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de CD80 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,019$).

Así mismo se realizó el estudio para la población CD11c- CD80+. En la Tabla 64 se muestran los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación.

Tabla 64. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c- CD80+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones, tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | CD80 (%) | CD80 (GMean) |
|---------------------------|----------|--------------|
| Control | 8,7±11,4 | 48,7±19,7 |
| ES | 4,5±1,1 | 47,9±17,4 |
| CE | 9,1±8,1 | 42,1±11,6 |
| Pam3CSK4 | 1,4±0,5 | 61,4±0,8 |
| Pam3CSK4+ES | 1,6±0,7 | 59,6±19,2 |
| Pam3CSK4+CE | 1,6±0,6 | 60,3±8,8 |
| HKLM | 1±0,2 | 58,6±2,5 |
| HKLM+ES | 1,4±0,5 | 58±7,5 |
| HKLM+CE | 1,2±0,2 | 58,4±2,9 |
| Poly (I:C) | 3,4±3,3 | 43,3±15,8 |
| Poly (I:C) +ES | 3,6±3,3 | 42±14,9 |
| Poly (I:C) +CE | 5±2,1 | 42,1±16,9 |
| Poly (I:C) LMW | 4,1±2,3 | 40,6±17,6 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 5,8±3,4 | 36,8±11,6 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 4,7±3,5 | 41,6±18 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 2,3±0,9 | 54,8±4,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 3,6±1,9 | 59,8±4,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 4,2±3,6 | 58,9±4,1 |
| ST-FLA | 8,1±6,3 | 40,4±16 |
| ST-FLA+ES | 6,4±4 | 40,1±15,2 |
| ST-FLA+CE | 6,5±4,1 | 40,5±14,6 |

La presencia de ES y CE disminuyó la población CD11c- CD80+ respecto al control negativo. La estimulación con los ligandos en solitario originó un decrecimiento en la población CD11c- CD80+ en todos los casos.

La asociación de ES o CE con los distintos ligandos presentó una tendencia hacia el incremento en la población estudiada respecto a los ligandos en solitario, con la excepción de ST-FLA, con el que se produjo un descenso en la población CD11c- CD80+ respecto a solo ST-FLA.

En cuanto a la expresión de CD80 en la población CD11c-, se observó un descenso tanto en presencia de ES o CE como bajo la acción de los ligandos respecto al control negativo, salvo en el caso de la estimulación con Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que generó un incremento respecto al control negativo.

Por último, la asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ensayados apenas modificó la expresión de CD80 en las células CD11c-. Solo al asociar ES o CE con LPS *E. coli* K12 tuvo lugar un incremento respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

2.2.3. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión de la molécula coestimuladora CD86

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ CD86+. En la Tabla 65 se muestran los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación.

La presencia de ES apenas modificó la población CD11c+ CD86+ respecto al control, mientras que CE la disminuyó levemente. En ningún caso fue estadísticamente significativo. Por otra parte, la estimulación con los ligandos en solitario originó un aumento en la población CD11c+ CD86+ en todos los casos.

La asociación de ES y CE con los distintos ligandos incrementó la población estudiada respecto al ligando solo en los siguientes casos: LPS *E. coli* K12 con ES, Pam3CSK4 con CE y HKLM o Poly (I:C) LMW con ES. Por el contrario, la asociación de CE con LPS *E. coli* K12 y de CE con Poly (I:C) LMW disminuyó la población CD11c+ CD86+ respecto a ambos ligandos en solitario.

En cuanto a la expresión de CD86 en la población CD11c+, esta apenas se vio modificada por ES y CE en solitario respecto al control, mientras que la estimulación con los ligandos de los TLR originó, en la mayoría de los casos, un incremento.

Por su parte, la asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR, apenas dio lugar a cambios en la expresión de CD86 respecto a los ligandos en solitario. Sin embargo, la combinación de CE con LPS *E. coli* K12 originó un descenso estadísticamente significativo en la expresión de CD86 respecto a solo LPS *E. coli* K12 ($p=0,04$) (Figura 93). La asociación de ES o CE con Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW también dio lugar a un descenso, pero en este caso la expresión de CD86 respecto a ambos ligandos en solitario no fue estadísticamente significativo.

Tabla 65. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ CD86+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|---------------------------|-----------|--------------|
| Control | 45,4±17 | 53,6±19,4 |
| ES | 48,6±13,5 | 50,7±9,5 |
| CE | 38,1±18,2 | 51,9±12,7 |
| Pam3CSK4 | 57±3,2 | 95,2±23,2 |
| Pam3CSK4+ES | 57±6,6 | 92,3±27,1 |
| Pam3CSK4+CE | 61,8±1,5 | 98,6±19,7 |
| HKLM | 53,7±4 | 92,7±28 |
| HKLM+ES | 57±5,6 | 94,9±32,1 |
| HKLM+CE | 61±3,6 | 93,8±15,4 |
| Poly (I:C) | 60,3±8,4 | 78,9±17,6 |
| Poly (I:C) +ES | 58,8±8,9 | 74,4±12,1 |
| Poly (I:C) +CE | 58,6±10,5 | 68±16,1 |
| Poly (I:C) LMW | 50,4±12,5 | 68,1±14,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 53,9±18,6 | 63,5±8,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 47,4±10,2 | 65,7±15,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 72, ±14 | 97±12,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 73,5±4,8 | 99,7±14,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 70,4±4,8 | 87,7±13,2 |
| ST-FLA | 54,3±8,7 | 61,3±16,2 |
| ST-FLA+ES | 53,9±13,1 | 62,7±15 |
| ST-FLA+CE | 54,1±22,2 | 59,4±15,1 |

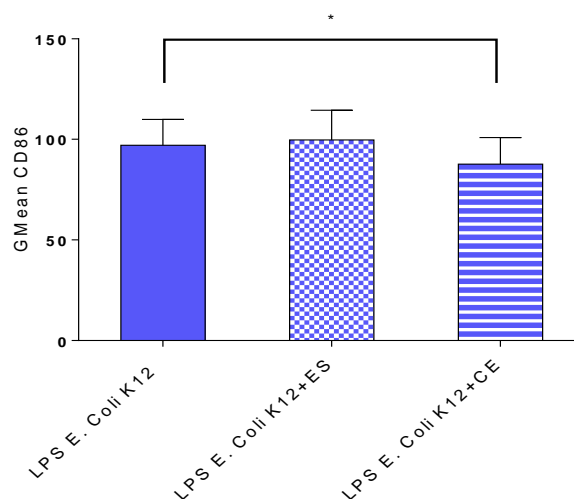


Figura 93. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86+ en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de CD86 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,013$).

Posteriormente, el estudio se realizó para la población CD11c- CD86+. En la Tabla 66 se muestran los resultados obtenidos tras 24 h de estimulación.

La presencia de ES y CE en solitario incrementó ligeramente la población CD11c- CD86+ respecto al control negativo. Por su parte, los ligandos de TLR originaron un descenso de dicha población, con la excepción de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que la incrementaron.

La asociación de ES o CE con los distintos ligandos apenas dio lugar a cambios en la población estudiada respecto a los ligandos en solitario, salvo en el caso de Poly (I:C) LMW con el que se produjo un aumento respecto a Poly (I:C) LMW en solitario, pero en ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la expresión de CD86 en la población CD11c-, ES la aumentó y CE la disminuyó respecto al control sin estimular. Por su parte, todos los ligandos en solitario la incrementaron. Al asociar ES o CE con los ligandos de los TLR, la expresión de CD86 se mantuvo más o menos estable respecto a cada uno de los ligandos en solitario, salvo en el caso de la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, que generó un descenso en la expresión de CD86 respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 66. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c- CD86+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | CD86 (%) | CD86 (GMean) |
|----------------------------------|----------|--------------|
| Control | 5,7±5,8 | 57,6±21,1 |
| ES | 6,4±5,6 | 69,6±7,4 |
| CE | 7,5±7 | 51,7±20,9 |
| Pam3CSK4 | 1,1±0,1 | 67,3±14,9 |
| Pam3CSK4+ES | 2±0,8 | 66,1±2,2 |
| Pam3CSK4+CE | 1,2±0,5 | 67,7±21,4 |
| HKLM | 1,4±0,5 | 66,9±12,6 |
| HKLM+ES | 2,2±0,1 | 71,5±9,7 |
| HKLM+CE | 1,4±0,6 | 68,6±1,7 |
| Poly (I:C) | 8,3±6,8 | 74,2±14,7 |
| Poly (I:C) +ES | 7,5±6 | 67,6±10,4 |
| Poly (I:C) +CE | 10,3±6,8 | 75±16,2 |
| Poly (I:C) LMW | 9,3±5,6 | 74,1±14 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 10,2±5 | 72,7±12,3 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 12,7±7,4 | 71,4±10,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 3±0,3 | 48,7±2,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 3,1±0,3 | 52±1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 3,4±0,7 | 48,6±3 |
| ST-FLA | 13,4±6,3 | 61,8±19,3 |
| ST-FLA+ES | 12,7±7,4 | 64,9±21,9 |
| ST-FLA+CE | 12,3±5,8 | 65,9±26,2 |

2.2.4. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad MHC I

Se analizó la población CD11c⁺ MHC I tras 24 h de estimulación. En la Tabla 67. se muestran los resultados obtenidos.

La población CD11c⁺ MHC I⁺ no se vio modificada en presencia de ES, mientras que CE la aumentó respecto al control sin estimular. Por su parte, la estimulación con los ligandos de TLR en solitario supuso en todos los casos un aumento en dicha población respecto al control sin estimular.

Al asociar ES o CE a dichos ligandos, la población CD11c⁺ MHC I⁺ se vio incrementada para LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario. Por el contrario, la asociación de ES o CE con Poly (I:C) y ST-FLA tuvo el efecto contrario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la expresión de MHC I en células CD11c⁺, se vio disminuida respecto al control tanto por ES como por CE, mientras que la estimulación con los ligandos de TLR la aumentó respecto a los ligandos en solitario, con la excepción de Pam3CSK4, HKLM y LPS *E. coli* K12, que la disminuyeron.

Tabla 67. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c⁺ MHC I⁺ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | MHC I (%) | MHC I (GMean) |
|----------------------------------|-----------|---------------|
| Control | 23,8±20,4 | 87±83,6 |
| ES | 22,1±20,4 | 82,3±58,1 |
| CE | 30,3±23,4 | 65±41,9 |
| Pam3CSK4 | 23,2±18,9 | 50,7±26,6 |
| Pam3CSK4+ES | 22,6±17,3 | 46,9±16,8 |
| Pam3CSK4+CE | 28,5±17,1 | 48,7±17,1 |
| HKLM | 35,5±20,6 | 59±33,8 |
| HKLM+ES | 36,5±20,6 | 59,6±35,8 |
| HKLM+CE | 33,4±15 | 52,7±21,5 |
| Poly (I:C) | 60,7±14,5 | 113,4±92,9 |
| Poly (I:C) +ES | 52±26,1 | 115,8±119,2 |
| Poly (I:C) +CE | 65,7±21,8 | 150,6±137,2 |
| Poly (I:C) LMW | 61,3±26 | 145,2±129,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 63,4±20,3 | 143,4±128,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 62,5±23,4 | 149,3±138,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 37,9±27,9 | 78,7±96,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 46,4±24,8 | 62,9±55,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 43,7±27,5 | 56,8±39,6 |
| ST-FLA | 68,4±20,1 | 284,7±207 |
| ST-FLA+ES | 63,5±33,5 | 278,6±201,6 |
| ST-FLA+CE | 65,5±23,8 | 242±166,8 |

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR originó bien un descenso en la expresión de MHC I o bien ningún cambio, salvo en el caso de CE con Poly (I:C) que incrementó la expresión de MHC I respecto a Poly (I:C) en solitario. En ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas.

De forma paralela se estudiaron las células CD11c- MHC I+ tras 24 h de estimulación. En la Tabla 68 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 68. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c- MHC I+, obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC I (%) | MHC I (GMean) |
|----------------------------------|-------------------|---------------|
| Control | 2,72±5,43 | 74±56,5 |
| ES | 1,42±1,82 | 52,8±45,5 |
| CE | 3,96±7,21 | 67,4±47,8 |
| Pam3CSK4 | 0,94±1,03 | 45,3±22,5 |
| Pam3CSK4+ES | 1,21±1,91 | 40,1±15,9 |
| Pam3CSK4+CE | 1,08±0,99 | 42,1±16,6 |
| HKLM | 1,75±1,54 | 58±29,7 |
| HKLM+ES | 1,77±1,74 | 52,3±31,7 |
| HKLM+CE | 1,33±1,15 | 55,8±23 |
| Poly (I:C) | 5,33±4,88 | 82,9±54,8 |
| Poly (I:C) +ES | 2,77±2,41 | 64,4±40,1 |
| Poly (I:C) +CE | 5,90±2,51 | 97,7±74,2 |
| Poly (I:C) LMW | 6,26±0,54 | 85,1±55 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 4,90±0,50 | 104,2±85,7 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 5,86±0,77 | 103,8±84 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 1,97±2,31 | 49±34,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 2,93±2,69 | 58,1±32,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 2,33±1,88 | 49±28,7 |
| ST-FLA | 6,09±2,89 | 120±70 |
| ST-FLA+ES | 6,29±3,89 | 126,2±76,4 |
| ST-FLA+CE | 10,05±3,04 | 158,4±114,6 |

La población CD11c- MHC I+ decreció en presencia de ES, mientras que CE la aumentó respecto al control. Así mismo, la estimulación con los ligandos de TLR en solitario dio en la mayoría de los casos una disminución en dicha población respecto al control, con la excepción de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la aumentaron.

Al asociar ES o CE a dichos ligandos, la población CD11c- MHC I+ se vio disminuida en el caso de Pam3CSK4 y HKLM respecto a ambos ligandos individualmente, mientras que dicha población se incrementó en el caso de Poly (I:C) LMW, LPS *E. coli* K12 y ST-FLA. Solo fue estadísticamente significativo el incremento de la población CD11c- MHC I+ en el caso de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 ($p=0,042$) (Figura 94).

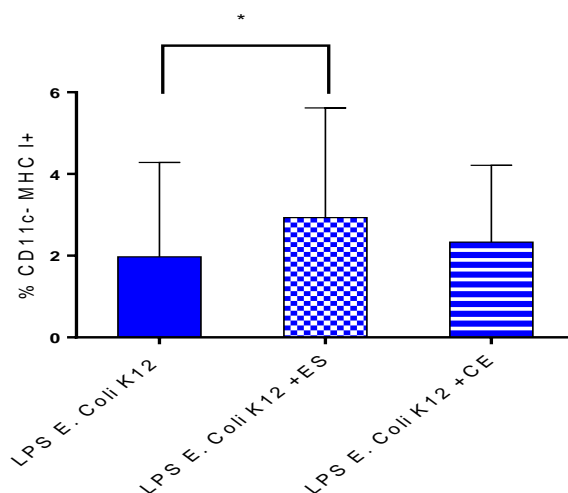


Figura 94. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,042$).

Por su parte, el incremento de la población CD11c- MHC I+ en el caso de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA en solitario también fue estadísticamente significativo ($p=0,008$) (Figura 95). Mientras que ES en combinación con Poly (I:C) LMW dio lugar a un descenso de la población CD11c- MHC I+ estadísticamente significativo ($p=0,015$) (Figura 96).

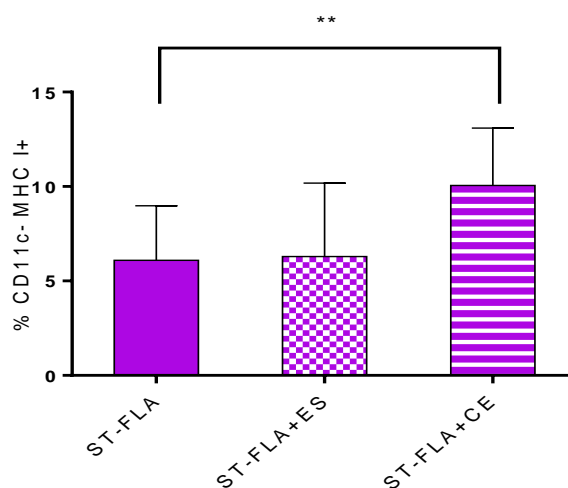


Figura 95. Resultado en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,008$).

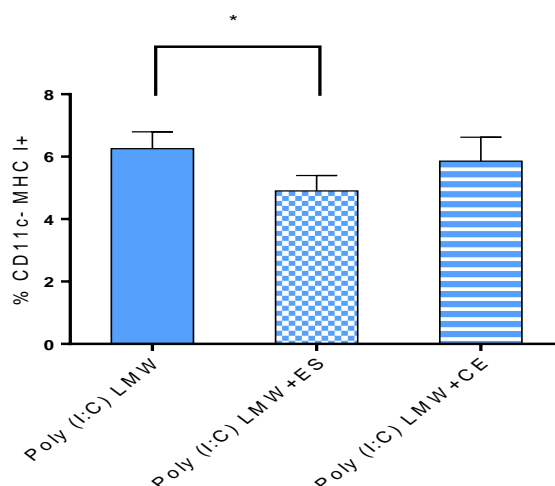


Figura 96. Resultado en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,015$).

En cuanto a la expresión de MHC I en las células CD11c-, esta se vio disminuida tanto por ES como por CE respecto al control negativo. Así mismo, los ligandos de TLR disminuyeron su expresión respecto al control, con la excepción de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la incrementaron.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR originó un incremento en la expresión de MHC I en el caso de Poly (I:C) LMW, LPS *E. coli* K12 y ST-FLA respecto a estos ligandos en solitario. Por el contrario, en el caso de Pam3CSK4 y HKLM la asociación con ES o CE ocasionó el descenso en la expresión de MHC I respecto a ambos en solitario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

2.2.5. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad MHC II

Se analizó la población CD11c+ MHC II+ tras 24 h de estimulación. Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la Tabla 69.

La estimulación con ES originó un suave incremento en la población CD11c+ MHC II+ respecto al control sin estimular, mientras que CE no la modificó. La estimulación con los ligandos de TLR la incrementaron respecto al control sin estimular, con la excepción de Pam3CSK4 y HKLM, que no la modificaron.

La asociación de ES con los diferentes ligandos mostró, en general, una tendencia a la disminución en la población CD11c+ MHC II+ respecto a cada uno de los ligandos individualmente. Por el contrario, la asociación con CE presentó el efecto contrario o bien no dio lugar a cambios respecto a los ligando en solitario.

Tabla 69. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|---------------------------|------------|----------------|
| Control | 71,2±20,7 | 217,2±109,7 |
| ES | 75,6±21,6 | 220±90,5 |
| CE | 70,5±22,7 | 221,1±136,5 |
| Pam3CSK4 | 72,6±21,3 | 380,2±201,2 |
| Pam3CSK4+ES | 71,6±25,9 | 381,4±200,3 |
| Pam3CSK4+CE | 73,3±22,1 | 397,8±224,9 |
| HKLM | 72,7±23,7 | 389,5±211,3 |
| HKLM+ES | 68,5±26,1 | 359±203,3 |
| HKLM+CE | 78,6±20,4 | 601,3±560 |
| Poly (I:C) | 76,4±12,9 | 197,5±103 |
| Poly (I:C) +ES | 72,6±17,9 | 212,2±142,6 |
| Poly (I:C) +CE | 77,8±20 | 192,8±176 |
| Poly (I:C) LMW | 76,5±19,6 | 224,7±229,3 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 63,9±30,4 | 221±194,3 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 80,4±18 | 173,7±124,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 86,1±12,8 | 654,5±478,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 83,9±14,5 | 524,7±348,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 86,5±13,8 | 491,9±339 |
| ST-FLA | 77,5±19,7 | 138,2±132,9 |
| ST-FLA+ES | 68,2±30,3 | 151,4±164,1 |
| ST-FLA+CE | 67,9±31,7 | 115,2±106,8 |

El descenso en la población CD11+ MHC II+ al asociar ES con HKLM respecto a HKLM individualmente fue estadísticamente significativo ($p=0,036$) (Figura 97).

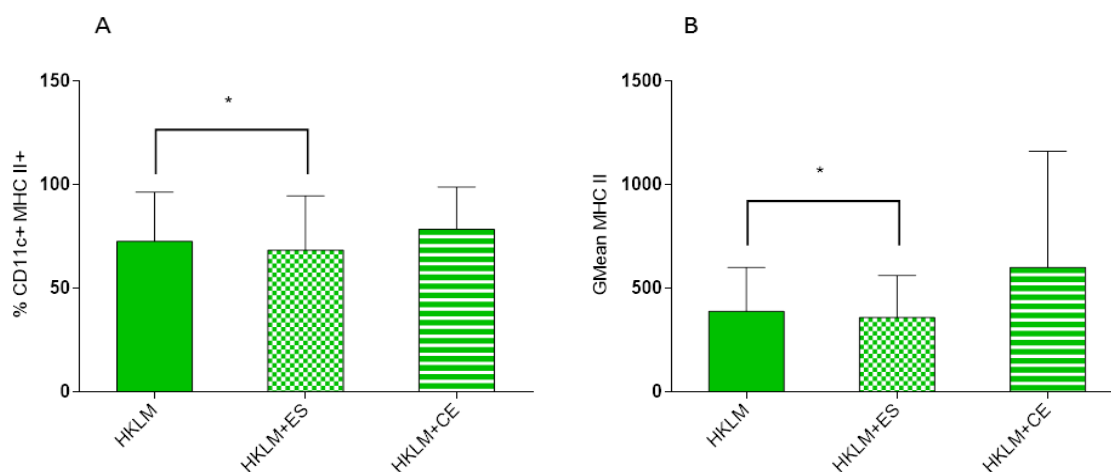


Figura 97. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p=0,036$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p=0,045$).

En cuanto a la expresión de MHC II en las células CD11c+, la presencia de ES y CE la elevó de forma discreta respecto al control negativo, mientras que todos los ligandos de TLR ensayados originaron un claro incremento en la expresión de dicha molécula respecto al control negativo. Únicamente la estimulación con ST-FLA presentó el efecto contrario.

Así mismo, la asociación de ES o CE con los ligandos de TLR modificó la expresión de MHC II+ respecto a cada uno de los ligandos. De este modo, la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, de HKLM con ES y de Poly (I:C) LMW con CE disminuyeron la expresión de MHC II respecto a cada uno de ellos en solitario.

El descenso en la expresión de MHC II al asociar ES o CE con LPS *E. coli* K12 respecto a solo LPS *E. coli* K12 fue estadísticamente significativo ($p=0,046$ y $p=0,037$, respectivamente) (Figura 98).

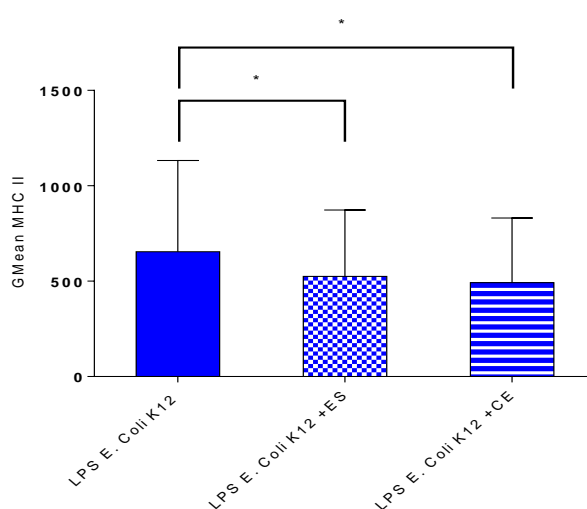


Figura 98. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,046$ y $p=0,037$, respectivamente).

El descenso en la expresión de MHC II al asociar ES con HKLM respecto a HKLM en solitario fue también estadísticamente significativo ($p=0,045$) (Figura 97). Por el contrario, la combinación de CE con Pam3CSK4, de ES con POLY (I:C) LMW y de ES con ST-FLA incrementó la expresión de MHC II respecto a cada uno de ellos en solitario, pero en ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas.

En segundo lugar, se estudiaron las células CD11c- MHC II+ tras 24 h de estimulación. En la Tabla 70, se muestran los resultados obtenidos.

La presencia de ES o CE no modificó la población CD11c- MHC II+, mientras que la estimulación con los ligandos de los TLR originó un descenso respecto al control negativo en todos los casos.

Por otro lado, la combinación de ES con cada uno de los ligandos mostró, en la mayoría de los casos, una tendencia hacia el descenso en la población CD11c- MHC II+. Por el contrario, la asociación de CE con cada uno de los ligandos mostró el efecto contrario.

En cuanto a la expresión de MHC II en células CD11c-, se vio incrementada en presencia de ES mientras que CE no dio lugar a cambios respecto al control. La estimulación con los ligandos de los TLR originó un descenso en la expresión de MHC II en todos los casos.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos de los TLR dio lugar a resultados diversos. En el caso de Pam3CSK4 y Poly (I:C), su asociación con ES o CE originó un descenso en la expresión de MHC II, que para Pam3CSK4 fue estadísticamente significativo ($p=0,028$ y $p=0,028$, respectivamente) (Figura 99).

Tabla 70 Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar, de células CD11c- MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | MHC II (%) | MHC II (GMean) |
|---------------------------|------------|--------------------|
| Control | 12,5±7,3 | 295±213,7 |
| ES | 12,6±8,6 | 348,9±208,1 |
| CE | 12±6 | 290,5±153,3 |
| Pam3CSK4 | 7,5±6,2 | 242,8±178,8 |
| Pam3CSK4+ES | 5,5±3,9 | 178,9±119,1 |
| Pam3CSK4+CE | 5,6±4,1 | 199,9±147,9 |
| HKLM | 6,1±3,9 | 183,3±112,4 |
| HKLM+ES | 5,6±3,6 | 190,1±127,6 |
| HKLM+CE | 8,9±9,6 | 193,3±111,7 |
| Poly (I:C) | 10±12,6 | 142±125,7 |
| Poly (I:C) +ES | 6,7±6,5 | 112,9±93,8 |
| Poly (I:C) +CE | 12,7±13,4 | 172,2±165,9 |
| Poly (I:C) LMW | 10,3±10,4 | 220,2±241,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 8,3±7,7 | 205,4±197,6 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 11,9±10,9 | 162,4±134,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 11,9±6,4 | 188,3±128,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 13,9±9,6 | 238,9±189,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 13,2±8,6 | 185,7±138,9 |
| ST-FLA | 10±5,3 | 166,7±210 |
| ST-FLA+ES | 9,1±9,3 | 186,7±237,8 |
| ST-FLA+CE | 8,4±9 | 162,2±193,6 |

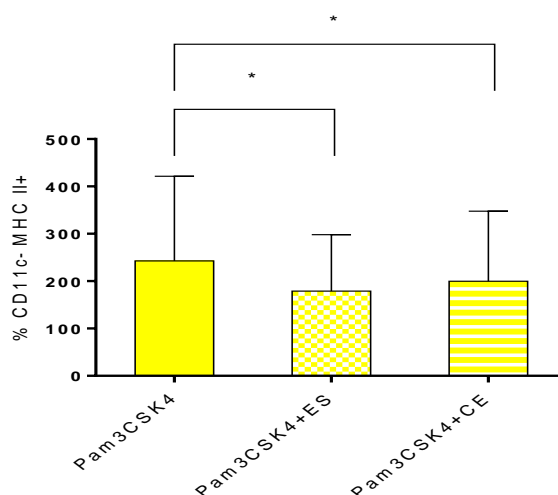


Figura 99. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a solo Pam3CSK4 ($p=0,028$ y $p=0,028$, respectivamente).

Por el contrario, la asociación de ES o CE con HKLM, así como de ES con LPS *E. coli* K12 dio lugar a un incremento en la expresión de MHC II respecto a ambos ligandos en solitario. La asociación de ES o CE con el resto de ligandos no dio lugar a grandes cambios en la expresión de MHC II. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

2.2.6. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC I y MHC II

Además de estudiar de forma independiente la expresión de las moléculas de superficie MHC I y MHC II, se determinó la expresión de ambas de forma simultánea en las células CD11c+. Es decir, se realizó un marcaje triple con CD11c, MHC I y MHC II, obteniéndose tres poblaciones diferenciadas: CD11c+ MHC I+ MHC II+, CD11c+ MHC I+ MHC II- y CD11c+ MHC I- MHC II+.

En primer lugar, se analizaron los resultados obtenidos para la población CD11c+ MHC I+ MHC II+ tras 24 h de estimulación. En la Tabla 71 se recogen los resultados obtenidos.

La población CD11c+ MHC I+ MHC II+ no se vio modificada en presencia de ES y CE respecto al control negativo, mientras que la mayoría de los ligandos ensayados la aumentaron respecto al control negativo. Solo la estimulación con Pam3CSK4 no dio lugar a cambios respecto al control sin estimular.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y ST-FLA, así como la combinación de ES con Pam3CSK4, HKLM y Poly (I:C) LMW, ocasionó un descenso en la población CD11c+ MHC I+ MHC II+ respecto a cada uno de estos ligandos en solitario. El descenso producido en presencia de ES en combinación con HKLM fue estadísticamente significativo respecto a solo HKLM ($p=0,014$) (Figura 100).

Tabla 71. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar, de células CD11c+ MHC I+ MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ MHC I+ MHC II+ (%) | MHC I+ (GMean) | MHCII+ (GMean) |
|------------------------------------|---------------------------|----------------|----------------|
| Control | 20,3±20,8 | 47,5±8,6 | 810,1±544,5 |
| ES | 19,1±17 | 42,1±3,8 | 837,5±436,8 |
| CE | 22,9±17,3 | 44,5±6,9 | 1168,4±697 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 47,5±13,5 | 39,1±7,8 | 1140,2±640,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 36,7±22,8 | 41±10,9 | 1286,3±714,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 33,5±28,5 | 47,1±22,7 | 1084,7±561,7 |
| CpG (ODN1826) | 39,6±20,7 | 43,1±13,9 | 1172,5±706,4 |
| CpG (ODN1826) +ES | 42,4±17,3 | 41,4±8,8 | 1042,5±583,9 |
| CpG (ODN1826) +CE | 37,9±19,2 | 40,4±4,8 | 1162,8±686,4 |
| Pam3CSK4 | 22,2±17,3 | 40,9±5,9 | 1223,7±733,6 |
| Pam3CSK4+ES | 19,3±9,8 | 40±0,8 | 1020,5±612,1 |
| Pam3CSK4+CE | 27,8±14,2 | 41,8±2,7 | 1194,9±753,7 |
| HKLM | 29,7±10,2 | 41,6±3 | 1200±684,8 |
| HKLM+ES | 23,2±10,4 | 41,1±1,7 | 1017,4±578,2 |
| HKLM+CE | 32,8±9,1 | 43,9±0,9 | 1226±754,3 |
| Poly (I:C) | 66,9±0,5 | 69,5±22,5 | 377,1±112,1 |
| Poly (I:C) +ES | 64,9±5,4 | 53,6±20,9 | 444,5±120,8 |
| Poly (I:C) +CE | 65,9±0,9 | 54,4±14,2 | 426,6±62,3 |
| Poly (I:C) LMW | 63,8±2,8 | 51,1±10,1 | 480,8±169,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 59,6±10,8 | 57,3±19,8 | 479,8±39,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 67,5±0,7 | 62,4±27,5 | 361,5±4,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 45,1±26,2 | 40,7±8,7 | 1590,4±849,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 46,2±23 | 39,9±5 | 1206,6±678,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 40,7±22,9 | 42,1±12,5 | 1078,6±616,7 |
| ST-FLA | 68±2,3 | 53,3±14,1 | 508,6±111,4 |
| ST-FLA+ES | 52,6±10,2 | 46±7,8 | 665,3±216,1 |
| ST-FLA+CE | 47,9±9 | 44,9±6,3 | 539,9±148,7 |

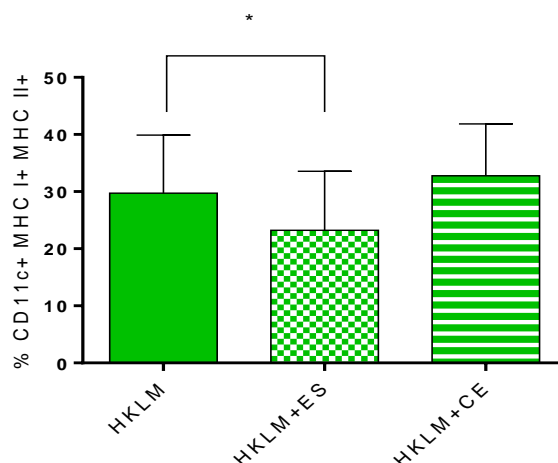


Figura 100. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,014$).

Por otra parte, la asociación de CE con Pam3CSK4, HKLM y Poly (I:C) LMW presentó un incremento de dicha población respecto a estos ligandos en solitario. En ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la expresión de las moléculas de superficie MHC I y MHC II en células CD11c+, presentaron perfiles diferentes. Así, la estimulación con ES o CE dio lugar a valores de expresión de MHC I menores, mientras que la expresión de MHC II se vio aumentada respecto al control sin estimular. Por su parte, la estimulación con los ligandos de TLR, originó un incremento en la expresión de ambas moléculas, MHC I y MHC II, excepto en el caso de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que la disminuyeron respecto al control negativo.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos originó un descenso en la expresión de MHC I en el caso de CpG (ODN1826), Pam3CSK4, Poly (I:C) y ST-FLA respecto a estos ligandos en solitario. Dicha disminución fue estadísticamente significativa para ES en combinación con Poly (I:C) respecto a solo Poly (I:C) ($p=0,045$) (Figura 101)

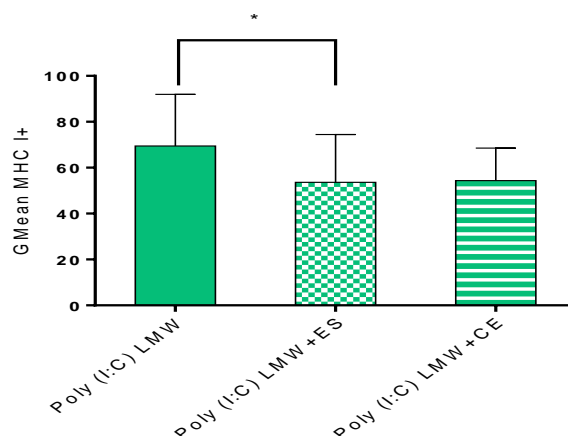


Figura 101. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,045$).

Por el contrario, la expresión de MHC I se vio incrementada al asociar ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 y Poly (I:C) LMW respecto ambos ligandos en solitario.

Por su parte, la expresión de MHC II se vio disminuida al asociar ES o CE con LPS *E. coli* K12, Pam3CSK4, así como ES con CpG (ODN1826) y HKLM respecto a estos ligandos en solitario. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo para ES o CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a solo LPS *E. coli* K12 ($p=0,034$, $p=0,024$, respectivamente) (Figura 102).

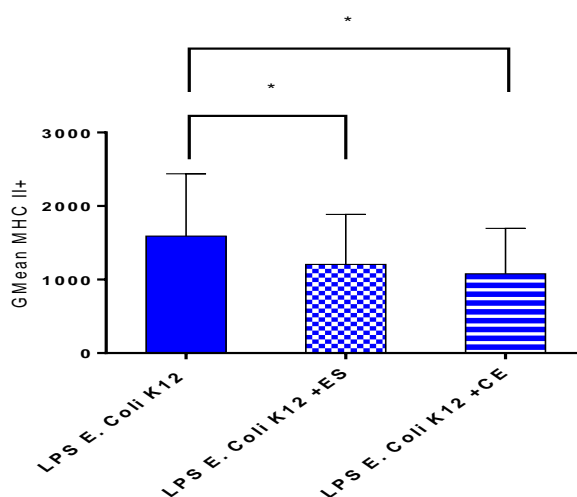


Figura 102. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,034$, $p=0,024$, respectivamente).

En contraste, la asociación de ES o CE con Poly (I:C), CE con Poly (I:C) LMW y ES con ST-FLA incrementó la expresión de MHC II respecto a cada uno de estos ligandos en solitario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Posteriormente, se analizó el porcentaje de células CD11c+ MHC I- MHC II+, obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 72 .

Tabla 72. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC I- MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ MHC I- MHC II+ (%) | MHC II+ (GMean) |
|------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| Control | 59,6±28,4 | 265±138 |
| ES | 58±25,2 | 217,7±91,7 |
| CE | 56,6±25,1 | 230,5±116,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 38,7±23,3 | 343,2±176,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 50,5±32,8 | 490,4±271,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 54,1±37,1 | 508,5±298 |
| CpG (ODN1826) | 46,1±32,7 | 420,4±246,2 |
| CpG (ODN1826) +ES | 42,5±27,9 | 417,2±226,7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 46,9±29,3 | 485±272,7 |
| Pam3CSK4 | 56,7±32,3 | 385,3±215 |
| Pam3CSK4+ES | 57,4±29,1 | 383,2±209 |
| Pam3CSK4+CE | 48,8±27,1 | 323,8±182,6 |
| HKLM | 49,6±24,8 | 289,3±150,3 |
| HKLM+ES | 52,7±22,6 | 319,5±153,5 |
| HKLM+CE | 44,5±23,8 | 272,4±135,5 |
| Poly (I:C) | 12,5±10,7 | 82±47 |
| Poly (I:C) +ES | 17,1±13 | 141,3±106,4 |
| Poly (I:C) +CE | 17±8,9 | 108,4±63,6 |
| Poly (I:C) LMW | 18,8±10,4 | 132,7±89,5 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 20,2±4,1 | 134,4±69,8 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 15,8±10,6 | 103,2±64,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 45,3±32,1 | 505,7±342,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 41,6±29,9 | 371,8±249,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 48,2±3,8 | 428±257,4 |
| ST-FLA | 11±7,9 | 150,2±44,6 |
| ST-FLA+ES | 27,4±13,1 | 236,3±113,4 |
| ST-FLA+CE | 29,7±7,2 | 198,4±137,3 |

El porcentaje de células CD11c+ MHC I- MHC II+ no se vio modificado por la presencia de ES ni CE en solitario respecto al control negativo. La estimulación con los ligandos de TLR dio lugar a una disminución de la población CD11c+ MHC I- MHC II+ respecto al control negativo en todos los casos.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ensayados dio lugar a un incremento de la población estudiada respecto a cada uno de los ligandos en el caso de LPS *E. coli* 026B6, Poly (I:C) y ST-FLA. Por el contrario, la asociación de CE con Pam3CSK4 la incrementó. La asociación de ES o CE no pareció influir en el efecto ocasionado por el resto de ligandos en solitario.

En lo que se refiere a la expresión de MHC II, esta decreció respecto al control sin estimular en presencia de ES y CE en solitario. El descenso en la expresión de MHC II en presencia de ES fue estadísticamente significativo ($p=0,041$) (Figura 103).

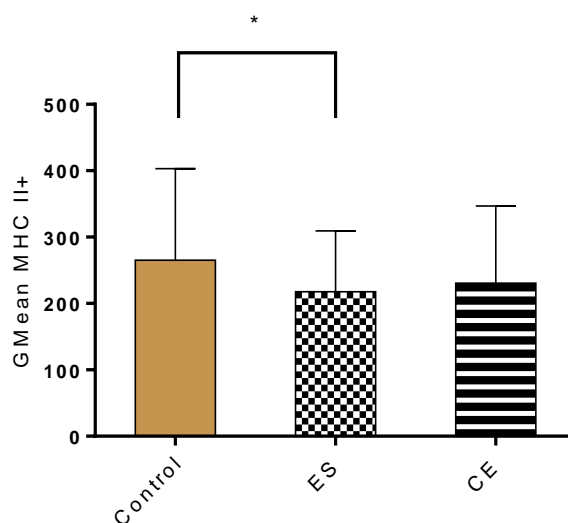


Figura 103. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+ MHC I- MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,041$).

Así mismo, la estimulación con los ligandos de los TLR originó un incremento en todos los casos, excepto en presencia de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la disminuyeron respecto al control negativo.

Por su parte, al combinar ES o CE con los ligandos de TLR, la expresión de MHC II se vio incrementada respecto a los ligandos en solitario para LPS *E. coli* 026B6, Poly (I:C), ST-FLA, así como para la combinación de CE con CpG (ODN1826) y de ES con HKLM. Sin embargo, la expresión se vio disminuida al asociar ES o CE con LPS *E. coli* K12, así como CE con Pam3CSK4 y Poly (I:C) LMW. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por último, se analizó el porcentaje de células CD11c+ MHC I+ MHC II-, obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 73.

El porcentaje de células CD11c+ MHC I+ MHC II- mostró una suave disminución en presencia de ES o CE respecto al control sin estimular, mientras que en presencia de los ligandos de los TLR se vio incrementada en la mayoría de los casos. En el caso de Pam3CSK4, HKLM y *E. coli* K12 no se originaron apenas modificaciones respecto al control negativo en esta población.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* K12 y HKLM ocasionó un incremento de las células CD11c+ MHC I+ MHC II- respecto a estos ligandos en solitario, mientras que la combinación con CpG (ODN1826), Poly (I:C) y ST-FLA tuvo el efecto contrario. En ningún caso se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, la expresión de MHC I en esta población se vio disminuida respecto al control por la acción de ES y CE en solitario, al igual que por los ligandos de TLR.

Por su parte, la asociación de ES o CE con los distintos ligandos, en general, no dio lugar a grandes cambios en la expresión de MHC I respecto a los ligandos en solitario, salvo para la asociación de LPS *E. coli* 026B6 con ES o CE, que ocasionó un incremento.

El incremento en la expresión de MHC I en la población CD11c+ MHC I+ MHC II- fue estadísticamente significativo para ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario ($p=0,032$) (Figura 104).

Tabla 73. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC I+ MHC II- obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD11c+ MHC I+ MHC II- (%) | MHC I+ (GMean) |
|------------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Control | 4,6±5,4 | 49±12,8 |
| ES | 3,4±4 | 42,7±3,9 |
| CE | 3±3,5 | 44,7±12 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 5,7±9,5 | 41,8±4,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 5,7±10,3 | 47,7±5,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 5,9±10,3 | 49,3±3,5 |
| CpG (ODN1826) | 6,9±12,8 | 40±2,3 |
| CpG (ODN1826) +ES | 5,9±10,5 | 39,1±3,5 |
| CpG (ODN1826) +CE | 5,9±10,1 | 37,8±4,3 |
| Pam3CSK4 | 4±6,1 | 42,8±5,9 |
| Pam3CSK4+ES | 3,4±4,7 | 37,6±3,1 |
| Pam3CSK4+CE | 4,7±6,5 | 42,9±5,6 |
| HKLM | 2,8±3,8 | 35,8±5,2 |
| HKLM+ES | 3,7±2,5 | 40,4±3 |
| HKLM+CE | 5,1±7 | 37,5±2,6 |
| Poly (I:C) | 10,5±6,9 | 44,7±10,6 |
| Poly (I:C) +ES | 8,9±5,2 | 41,6±8,4 |
| Poly (I:C) +CE | 8,3±5,6 | 49,8±18,6 |
| Poly (I:C) LMW | 6,8±3,1 | 46,4±12,3 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 7,1±1,4 | 40,9±10 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 6,7±5,7 | 37,7±2,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 3,6±5,6 | 43,2±6,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 5±7,6 | 44,3±11,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 5,9±11,2 | 42,6±7 |
| ST-FLA | 14,2±7,5 | 40,1±7,1 |
| ST-FLA+ES | 7,7±5,9 | 38,3±4,5 |
| ST-FLA+CE | 7,5±3,3 | 38±1,9 |

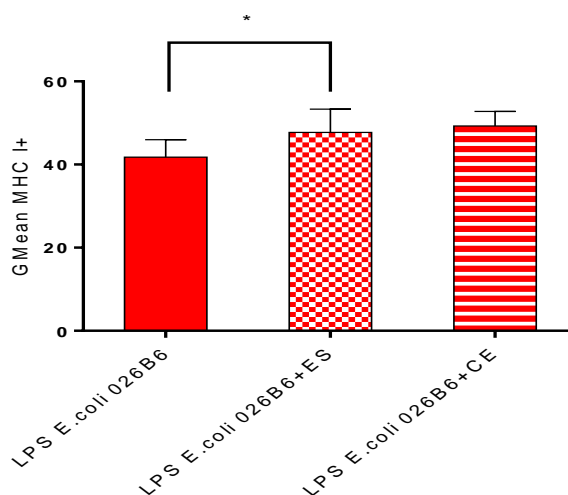


Figura 104. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC I+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,032$).

2.2.7. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión intracelular de la citocina IL-10

La expresión intracelular de la IL-10 se determinó tras 12 h de estimulación. Así, se analizó el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ y su nivel de expresión intracelular (GMean). En la Tabla 74 se muestran los resultados obtenidos.

Tras 12 h de estimulación, la presencia de ES incrementó levemente el porcentaje de células CD11c+ IL-10+ presentes, mientras que CE lo disminuyó respecto al control sin estimular. La estimulación con los ligandos de TLR dio lugar a un descenso en dicha población respecto al control negativo en todos los casos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La asociación de ES o CE con los ligandos de TLR mostró una tendencia discreta a disminuir la población CD11c+ IL-10+ respecto a estos ligandos en solitario, especialmente al asociar ES o CE con LPS *E. coli* K12, o Pam3CSK4. Sin embargo, al combinar ES o CE con HKLM, ES con Poly (I:C) LMW y CE con ST-FLA, la población CD11c+ IL-10+ presentó un incremento respecto ambos ligandos en solitario. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la expresión intracelular de IL-10 en las células CD11c+, ES y CE incrementaron dicha expresión respecto al control, mientras que los ligandos de los TLR siempre la disminuyeron, con la única excepción de Poly (I:C) que presentó el efecto contrario.

Tabla 74. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c⁺ IL-10⁺ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-10 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | IL-10, 12 h (%) | IL-10, 12 h (GMean) |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|
| Control | 13,7±11,4 | 87,2±73,9 |
| ES | 18±18 | 99,3±95,1 |
| CE | 7,5±2,8 | 101,5±77,2 |
| Pam3CSK4 | 7,2±3,9 | 72,3±48 |
| Pam3CSK4+ES | 6,7±4,3 | 75±60,6 |
| Pam3CSK4+CE | 5,6±3,5 | 66,5±35,4 |
| HKLM | 6±3,8 | 66,5±33,7 |
| HKLM+ES | 7,2±4,9 | 92,8±67,7 |
| HKLM+CE | 8±5,2 | 82,3±65,3 |
| Poly (I:C) | 9,5±5,3 | 99±75,7 |
| Poly (I:C) +ES | 9,6±4,8 | 70,4±42,8 |
| Poly (I:C) +CE | 8,2±4,2 | 81,7±61,6 |
| Poly (I:C) LMW | 9,9±5,5 | 79,1±56,7 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 11,9±8,3 | 76,2±38 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 9,7±1,9 | 78,1±55,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 9,8±5,2 | 107,3±104,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 7,4±3,9 | 79±51,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 6,7±3,6 | 140,3±162,8 |
| ST-FLA | 9,3±3,7 | 65,4±17,6 |
| ST-FLA+ES | 7,9±1,7 | 66±31,7 |
| ST-FLA+CE | 12,8±6,1 | 60,5±32,3 |

La asociación tanto de ES como de CE con los ligandos no dio lugar a grandes cambios en la expresión intracelular de dicha citocina respecto a los ligandos en solitario. Si bien CE en combinación con LPS *E. coli* K12, así como ES o CE con HKLM ocasionaron un incremento en la expresión de IL-10 respecto a estos ligandos en solitario. Por el contrario, la asociación de ES o CE con Pam3CSK4 y Poly (I:C) disminuyó aún más la expresión de esta citocina ocasionada por estos ligandos en solitario.

Por último, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c⁻ IL-10⁺. En la Tabla 75 se muestran los resultados obtenidos.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c⁻ IL-10⁺ se vio disminuida por ES e incrementada por CE respecto al control negativo. Por su parte, la estimulación con los ligandos de TLR la disminuyó en todos los casos.

La asociación de ES o CE con Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW ocasionó un incremento de la población CD11c⁻ IL-10⁺ respecto a estos ligandos en solitario. Por el contrario, la asociación con LPS *E. coli* K12 tuvo el efecto contrario. La combinación de ES o CE con el resto de ligandos no dio lugar a grandes cambios respecto a estos en solitario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por su parte, la expresión de IL-10 en células CD11c- se vio incrementada por la presencia de ES y disminuida por CE respecto al control. La estimulación con los ligandos de TLR no dio lugar a apenas cambios, excepto en el caso de Pam3CSK4, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, que la aumentaron respecto al control.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos incrementó la expresión de IL-10 al asociarlos con Poly (I:C) LMW y ST-FLA, así como ES con Poly (I:C) respecto a estos en solitario. Por el contrario, la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* K12, así como CE con HKLM y Poly (I:C) la disminuyeron respecto a estos en solitario. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 75. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- IL-10+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-10 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

| | IL-10, 12 h (%) | IL-10, 12 h (GMean) |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|
| Control | 0,87±0,94 | 30,2±20,1 |
| ES | 0,36±1,4 | 38,1±47,9 |
| CE | 1,5±4,1 | 25,2±36,7 |
| Pam3CSK4 | 0,38±0,61 | 43,7±48,9 |
| Pam3CSK4+ES | 0,42±0,89 | 36,8±33,5 |
| Pam3CSK4+CE | 0,38±0,81 | 47,2±54,1 |
| HKLM | 0,54±0,85 | 33,2±20,3 |
| HKLM+ES | 0,43±0,74 | 31,6±25,3 |
| HKLM+CE | 0,56±1,2 | 28,4±16,2 |
| Poly (I:C) | 0,38±0,53 | 48±110,3 |
| Poly (I:C) +ES | 0,74±0,82 | 55,1±52,7 |
| Poly (I:C) +CE | 0,35±0,46 | 29,6±44,5 |
| Poly (I:C) LMW | 0,54±0,69 | 37,2±25,4 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 0,73±2,18 | 52,6±82,2 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 0,47±1,21 | 73,6±167,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 0,65±0,85 | 45±43,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 0,53±0,8 | 39±57,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 0,5±0,7 | 38,9±39,5 |
| ST-FLA | 0,78±1,23 | 32,4±31,9 |
| ST-FLA+ES | 0,51±0,91 | 45,4±135,8 |
| ST-FLA+CE | 0,89±4,39 | 47±146,1 |

2.2.8. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión intracelular de la citocina IL-12

La expresión intracelular de la IL-12 se determinó tras 12 h de estimulación. Así, se analizó el porcentaje de células CD11c+ IL-12+ y su nivel de expresión intracelular (GMean). En la Tabla 76 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 76. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-12 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | IL-12, 12 h (%) | IL-12, 12 h (GMean) |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|
| Control | 9±4 | 39,8±23,9 |
| ES | 9,6±6,6 | 40,3±23,3 |
| CE | 11,1±8 | 33,9±12,5 |
| Pam3CSK4 | 43,4±24,8 | 53,1±4,7 |
| Pam3CSK4+ES | 35,9±16,5 | 45,9±3,3 |
| Pam3CSK4+CE | 34,1±10,6 | 53,6±21,4 |
| HKLM | 26,3±3,3 | 42,4±9,7 |
| HKLM+ES | 36,8±31,5 | 50,5±20 |
| HKLM+CE | 34,5±12,7 | 52,5±27,8 |
| Poly (I:C) | 21,1±27,2 | 37,4±6,2 |
| Poly (I:C) +ES | 18,4±20,3 | 37±5 |
| Poly (I:C) +CE | 17,6±12,6 | 40,8±6,1 |
| Poly (I:C) LMW | 11,3±11,9 | 37,7±1,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 12,6±11,2 | 41,4±7,1 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 15,2±7,6 | 38,6±7,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 32,1±21,2 | 45,5±4,7 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 32,8±23,5 | 47,1±8,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 30±26,7 | 42±5,3 |
| ST-FLA | 10,5±5,3 | 40,7±6,3 |
| ST-FLA+ES | 10,4±6,8 | 41,1±9,1 |
| ST-FLA+CE | 16,9±10,2 | 59,3±40,7 |

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c+ IL-12+ no se vio modificada apenas por la presencia de ES o CE respecto al control sin estimular, si bien, la estimulación con CE la incrementó de forma discreta. La estimulación con los ligandos de TLR la aumentó en todos los casos, con la única excepción de ST-FLA, que no la modificó respecto al control negativo.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó un descenso de las células CD11c+ IL-12+ respecto a los ligandos en solitario en el caso de Pam3CSK4 y Poly (I:C), mientras que la combinación de ES o CE con HKLM y Poly (I:C) LMW presentó el efecto contrario. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la expresión de IL-12 en células CD11c+, presentó un suave descenso en presencia de CE, mientras que ES no originó ningún cambio respecto al control. Por su parte, la estimulación con los ligandos de TLR la incrementó claramente, excepto en el caso de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que no la modificaron respecto al control. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La asociación de ES con Pam3CSK4 disminuyó la expresión de IL-12 respecto a solo Pam3CSK4. Por el contrario, la asociación de CE con ST-FLA, así como de ES o CE con HKLM la incrementaron respecto a los ligandos en solitario. La combinación de ES o CE

con el resto de ligandos no originó apenas cambios en la expresión de IL-12. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Por último, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c- IL-12+. En la Tabla 77 se muestran los resultados obtenidos.

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c- IL-12+ se vio incrementada por CE, mientras que ES no pareció afectarla respecto al control. La estimulación con los ligandos de TLR la incrementó en todos los casos respecto al control. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 77. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-12 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas.

| | IL-12, 12 h (%) | IL-12, 12 h (GMean) |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|
| Control | 0,67±0,56 | 25,7±17,3 |
| ES | 0,72±0,71 | 24,9±14,2 |
| CE | 1,45±0,27 | 20,7±1,2 |
| Pam3CSK4 | 5,1±4,05 | 32±11,6 |
| Pam3CSK4+ES | 5,43±0,81 | 28,2±9,8 |
| Pam3CSK4+CE | 3,72±0,69 | 30,2±9,7 |
| HKLM | 3,97±1,86 | 32,3±12,7 |
| HKLM+ES | 4,77±6,96 | 28,5±10,4 |
| HKLM+CE | 4,21±1,98 | 30,3±10,4 |
| Poly (I:C) | 1,75±4,96 | 25,7±7,6 |
| Poly (I:C) +ES | 2,06±4,1 | 25,4±4,2 |
| Poly (I:C) +CE | 2,26±1,24 | 28,1±6,1 |
| Poly (I:C) LMW | 1,26±1,61 | 30,2±9,7 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 1,63±1,6 | 27,4±6,9 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 1,78±0,83 | 27,2±7,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 3,89±7,7 | 30,2±10 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 3,97±8,32 | 31,3±13,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 2,68±7,54 | 28,4±9,6 |
| ST-FLA | 2,05±0,72 | 28±8,4 |
| ST-FLA+ES | 1,52±0,54 | 27±7,5 |
| ST-FLA+CE | 0,5±0,99 | 22,3±7,8 |

La asociación de ES o CE con HKLM dio lugar a un incremento de la población CD11c- IL-12+ respecto a solo HKLM. Por el contrario, la combinación de ES o CE con ST-FLA ocasionó el efecto contrario. El descenso en la población CD11c- IL-12+ para ES en combinación con ST-FLA fue cercano a la significancia respecto a ST-FLA en solitario ($p=0,05$) (Figura 105).

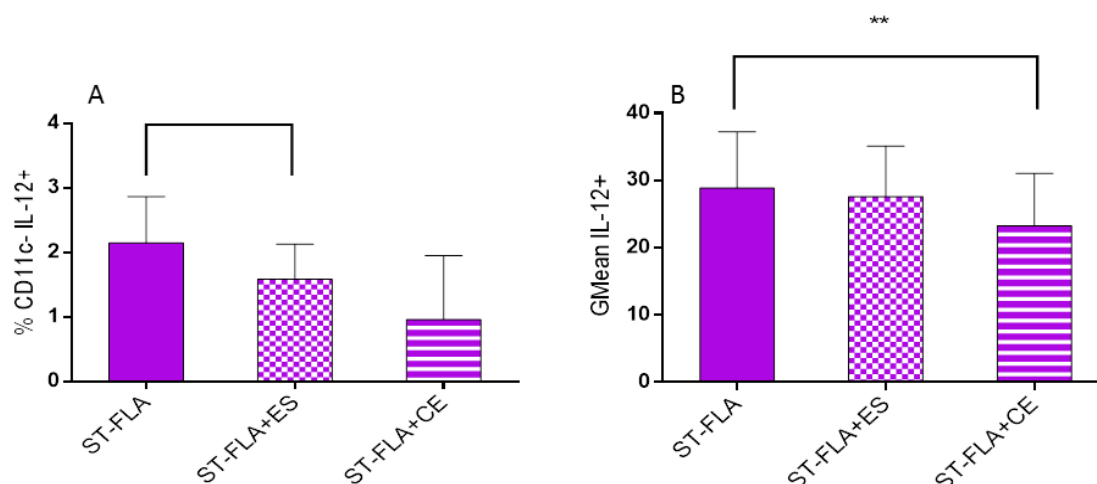


Figura 105. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue cercano a la significancia en presencia de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,05$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c- IL-12+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,005$).

La asociación de ES o CE con el resto de ligandos ensayados no ocasionó grandes cambios respecto al efecto ocasionado por estos ligandos en solitario.

Por su parte, la expresión de IL-12 en células CD11c- no se vio modificada ni por ES ni por CE respecto al control sin estimular. La estimulación por los ligandos de los TLR incrementó su expresión respecto al control negativo en todos los casos. No se encontraron, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas.

En casi todos los casos, la asociación de ES o CE con los diferentes ligandos presentó un descenso en la expresión de IL-12 muy discreto respecto a los ligandos individualmente. Dicho descenso fue estadísticamente significativo en el caso de CE en combinación con ST-FLA respecto a solo ST-FLA ($p=0,005$) (Figura 105).

2.2.9. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión intracelular de la citocina TNF- α

En el caso concreto de esta citocina, solo se testó tras 12 h de estimulación. Además, se incluyeron los datos obtenidos al estimular con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6, aparte del resto que se venían ensayando hasta ahora.

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ TNF- α +. En la Tabla 78 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 78. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c TNF- α + en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de TNF- α en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas.

| | TNF- α , 12 h (%) | TNF- α , 12 h (GMean) |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Control | 24,8 \pm 41,8 | 26,2 \pm 14,4 |
| ES | 15,6 \pm 19,2 | 23 \pm 7,9 |
| CE | 22 \pm 14,6 | 26,2 \pm 6,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 17,8 \pm 3,7 | 21,6 \pm 8,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 20,2\pm1,3 | 23,8 \pm 6,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 22,8 \pm 3,7 | 22,4 \pm 2,4 |
| CpG (ODN1826) | 28,2 \pm 5,4 | 35,1 \pm 11,5 |
| CpG (ODN1826) +ES | 31,9 \pm 8,5 | 39,3 \pm 10,3 |
| CpG (ODN1826) +CE | 26,6 \pm 6,4 | 29,4 \pm 6 |
| Pam3CSK4 | 52,9 \pm 24,1 | 44,4 \pm 10,9 |
| Pam3CSK4+ES | 53,9 \pm 32,7 | 39 \pm 9, 6 |
| Pam3CSK4+CE | 53 \pm 24,4 | 45,5 \pm 3,7 |
| HKLM | 53,1 \pm 33,2 | 41,4 \pm 9,7 |
| HKLM+ES | 42,2 \pm 4,9 | 48,8 \pm 19,2 |
| HKLM+CE | 41,6 \pm 8,7 | 60,5 \pm 32,5 |
| Poly (I:C) | 20,4 \pm 11,9 | 19,1 \pm 5,8 |
| Poly (I:C) +ES | 19,4 \pm 10,5 | 19 \pm 4,6 |
| Poly (I:C) +CE | 31,7 \pm 14,7 | 26,9 \pm 12,8 |
| Poly (I:C) LMW | 10,3 \pm 5,5 | 16,5 \pm 0,3 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 16,1 \pm 4,4 | 17,5\pm0,5 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 30,3 \pm 15 | 24,9 \pm 11,2 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 30,6 \pm 27,1 | 24,7 \pm 10 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 34 \pm 32 | 27,9 \pm 14,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 37,2 \pm 34,8 | 36,3 \pm 18,4 |
| ST-FLA | 10,7 \pm 2,6 | 21,9 \pm 4,1 |
| ST-FLA+ES | 12,2 \pm 5,7 | 21,6 \pm 1,3 |
| ST-FLA+CE | 13,3 \pm 14, | 29,6 \pm 12,2 |

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c+ TNF- α + no se vio modificada por CE, mientras que ES la disminuyó levemente respecto al control negativo. La estimulación con los ligandos de TLR la incrementó, con la única excepción de LPS *E. coli* 026B6, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que o bien no la modificaron o bien la disminuyeron. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó un incremento de las células CD11c+ TNF- α + respecto a los ligandos en solitario, en especial en el caso de LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* K12, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA. Por el contrario, la asociación de ES o CE con HKLM presentó el efecto contrario respecto a solo HKLM.

En el caso concreto de LPS *E. coli* 026B6, el incremento en la población CD11c+ TNF- α + fue estadísticamente significativo respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,021$) (Figura 106).

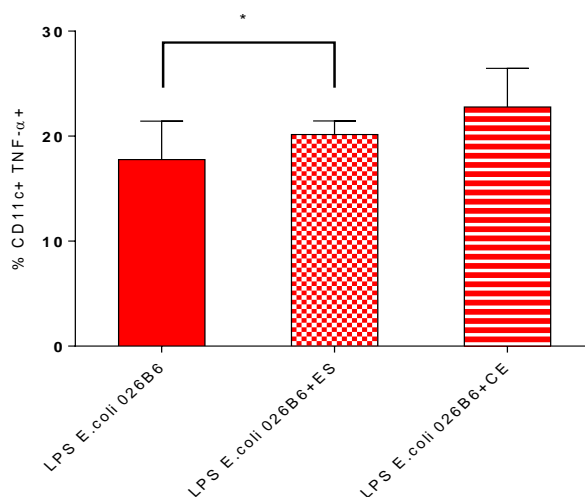


Figura 106. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ TNF-α+ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,021$).

Por su parte, la expresión intracelular de TNF-α en células CD11c+ no se vio modificada respecto al control sin estimular con ES o CE, mientras que la estimulación con los ligandos la incrementó, salvo en el caso de LPS *E. coli* 026B6, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la disminuyeron. Por su parte, la asociación de ES o CE con los ligandos mostró, en general, una tendencia a aumentar la expresión intracelular de TNF-α respecto a los ligandos en solitario. El incremento fue estadísticamente significativo para ES en combinación con Poly (I:C) LMW ($p=0,034$) (Figura 107).

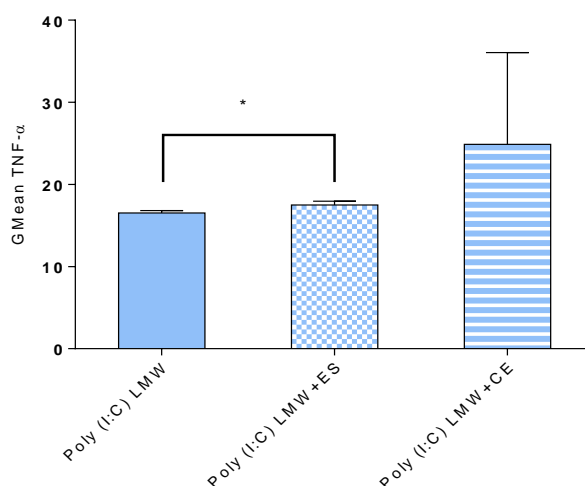


Figura 107. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF-α en células CD11c+ TNF-α+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de TNF-α fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,034$).

Por último, se analizaron las células que no expresaron CD11c: CD11c- TNF-α+. En la Tabla 79 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 79. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- TNF- α + en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de TNF- α en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas.

| | TNF- α , 12 h (%) | TNF- α , 12 h (GMean) |
|------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Control | 5,2 \pm 10 | 28 \pm 4 |
| ES | 1,7 \pm 2,4 | 22,8 \pm 8,6 |
| CE | 2,4 \pm 1,5 | 23,1 \pm 10,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 8,2 \pm 5,4 | 20,6 \pm 7,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 10,5 \pm 3,8 | 22,6 \pm 4,5 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 10,5 \pm 3,1 | 20,8 \pm 0,8 |
| CpG (ODN1826) | 4,6 \pm 3,6 | 28,8 \pm 8,8 |
| CpG (ODN1826) +ES | 5,1 \pm 2,3 | 29,2 \pm 8,4 |
| CpG (ODN1826) +CE | 6,3 \pm 2,5 | 24,9 \pm 7,5 |
| Pam3CSK4 | 16,6 \pm 7,7 | 32,7 \pm 5,9 |
| Pam3CSK4+ES | 13,4 \pm 9,2 | 29,7 \pm 5,5 |
| Pam3CSK4+CE | 12,1 \pm 6,2 | 31,1 \pm 3 |
| HKLM | 12,1 \pm 10,2 | 30,3 \pm 6,3 |
| HKLM+ES | 5,6 \pm 0,8 | 37,1 \pm 10,8 |
| HKLM+CE | 6,7 \pm 3 | 37 \pm 12,7 |
| Poly (I:C) | 4,3 \pm 4,2 | 17,3 \pm 3,9 |
| Poly (I:C) +ES | 3,8 \pm 5,5 | 17,1 \pm 3,4 |
| Poly (I:C) +CE | 4,7 \pm 2,7 | 20,9 \pm 8,3 |
| Poly (I:C) LMW | 1,8 \pm 1,8 | 15,5 \pm 1,6 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 2,5 \pm 0,8 | 17,2 \pm 2,5 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 5 \pm 2,9 | 21,7 \pm 9,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 8,7 \pm 3,2 | 21,7 \pm 5,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 11,1 \pm 7,1 | 22,9 \pm 6,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 13,2 \pm 13,9 | 25,6 \pm 9,2 |
| ST-FLA | 1,7 \pm 0,7 | 20,4 \pm 4,7 |
| ST-FLA+ES | 2,2 \pm 0,8 | 19,5 \pm 3,7 |
| ST-FLA+CE | 1,4 \pm 1,7 | 22,9 \pm 13,1 |

La presencia de ES y CE disminuyó la población CD11c- TNF- α + respecto al control negativo. Por el contrario, la estimulación con los ligandos de los TLR incrementó la población CD11c- TNF- α + respecto al control negativo, con la excepción de Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que la disminuyeron.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c- TNF- α + respecto a los ligandos en solitario para LPS *E. coli* 026B6, CpG (ODN1826), Poly (I:C) LMW y LPS *E. coli* K12. Por el contrario, la asociación de ES o CE con Pam3CSK4 y HKLM originó un descenso en la población CD11c- TNF- α + respecto a ambos ligandos en solitario. En el caso de CE en combinación con Pam3CSK4, la disminución en la población CD11c- TNF- α + fue estadísticamente significativa respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,045$) (Figura 108).

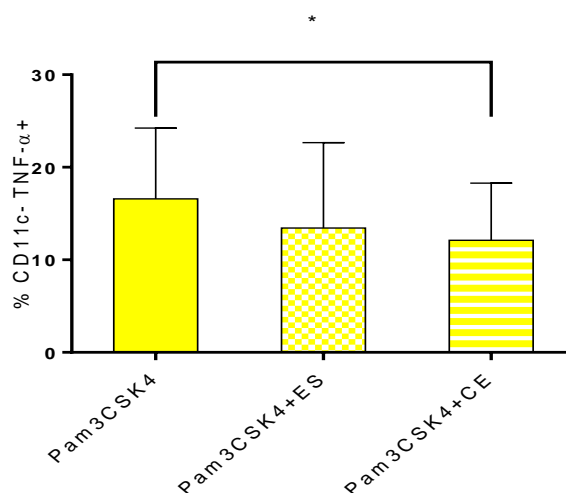


Figura 108. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- TNF-α+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,045$).

Respecto a la expresión intracelular de TNF-α+ en células CD11c-, la presencia de ES o CE en solitario la disminuyó respecto al control sin estimular. Por su parte la estimulación con los ligandos de los TLR, en la mayoría de los casos, o bien no originó cambios o bien mostró una tendencia a disminuir dicha expresión respecto al control sin estimular, con las excepciones de Pam3CSK4, HKLM y CpG (ODN1826). En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR ocasionó el incremento en la expresión de TNF-α respecto a los ligandos en solitario en el caso concreto de LPS *E. coli* K12, HKLM y Poly (I:C) LMW. En el resto de caso la combinación con ES o CE apenas dio lugar a cambios respecto al efecto producido por el propio ligando es solitario. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

2.2.11. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión intracelular del factor de transcripción Myd88

La expresión intracelular del factor de transcripción Myd88 se testó tras 12 h de estimulación. Además, se incluyeron los datos obtenidos al estimular con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6, aparte del resto que se venían ensayando hasta ahora.

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ Myd88+. En la Tabla 80 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 80. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ Myd88+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de Myd88 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | Myd88 (%) | Myd88 (GMean) |
|------------------------------------|-----------|---------------|
| Control | 85,1±14 | 45±18,7 |
| ES | 90,4±7,7 | 47,1±17,5 |
| CE | 90,4±7,6 | 53,3±26,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 96,6±1,5 | 53,3±17,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 98,1±1,7 | 102,3±81,8 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 96,6±3,5 | 131,3±127,1 |
| CpG (ODN1826) | 98,1±1,2 | 65,1±6,1 |
| CpG (ODN1826) +ES | 97,9±1,6 | 64,7±18,3 |
| CpG (ODN1826) +CE | 93,6±2,3 | 48±15,3 |
| Pam3CSK4 | 90,5±6,6 | 46,9±20,9 |
| Pam3CSK4+ES | 91,8±7,4 | 50,2±32,9 |
| Pam3CSK4+CE | 90,5±7,7 | 45,4±13,9 |
| HKLM | 90,6±8,3 | 45,8±21,5 |
| HKLM+ES | 92,4±5,5 | 51,1±9,7 |
| HKLM+CE | 88,4±7,6 | 43,2±10,5 |
| Poly (I:C) | 94,3±3 | 46,5±12,7 |
| Poly (I:C) +ES | 92,5±6,1 | 53,3±21,6 |
| Poly (I:C) +CE | 84,8±14,2 | 45,8±12,9 |
| Poly (I:C) LMW | 80,1±23,1 | 44±16,3 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 82,8±18 | 48,5±24,1 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 86,1±16,2 | 55,6±26,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 94,5±1,9 | 46±11,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 95,4±2,4 | 48,9±11 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 93,9±3,4 | 47±10,4 |
| ST-FLA | 87,6±14,8 | 69,9±50 |
| ST-FLA+ES | 83,8±20,6 | 54,2±30,6 |
| ST-FLA+CE | 61,8±40,5 | 41,1±13,5 |

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c+ Myd88+ se vio incrementada por la presencia de ES o CE solos respecto al control negativo, así como por los ligandos de los TLR de forma general, con la única excepción de Poly (I:C) LMW y ST-FLA, que no la modificaron respecto al control negativo.

La asociación de ES o CE con los ligandos de los TLR no dio lugar a grandes cambios en el porcentaje de células CD11c+ Myd88+ respecto a los ligandos en solitario. Sin embargo, sí se apreció una disminución de dicha población al asociar ES o CE con ST-FLA respecto a ST-FLA que, sin embargo, no fue estadísticamente significativa. La asociación de CE con Poly (I:C) también originó un descenso de la población estudiada respecto a solo Poly (I:C). Por el contrario, Poly (I:C) LMW en combinación con CE la incrementó. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En cuando a la expresión intracelular de Myd88 en células CD11c+, la presencia de ES no la modificó, mientras que CE la incrementó respecto al control. Por su parte, la estimulación

con los ligandos de TLR apenas dio lugar a cambio alguno respecto al control. Tan solo bajo la estimulación de LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) se vio levemente incrementada. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6, Poly (I:C) LMW, así como de ES con Poly (I:C), ocasionó un incremento en la expresión de Myd88 respecto a estos ligandos en solitario. Por el contrario, la asociación de ES o CE con CpG (ODN1826) y ST-FLA presentó el efecto contrario. De nuevo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En segundo lugar, se analizó la población CD11c- Myd88+. Los resultados se muestran en la Tabla 81.

Tabla 81. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- Myd88+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de Myd88 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | Myd88 (%) | Myd88 (GMean) |
|-----------------------------|-----------|---------------|
| Control | 31,2±20,3 | 30,3±11 |
| ES | 39,5±23,7 | 31,1±9,7 |
| CE | 48,2±23,2 | 39,8±19,2 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 49,3±16,6 | 33,7±8,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 53,6±15,7 | 31,5±2,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 52,3±20,4 | 31,8±5,5 |
| CpG (ODN1826) | 51,8±22,4 | 36,3±7,9 |
| CpG (ODN1826)+ES | 50,3±27,7 | 32,7±4 |
| CpG (ODN1826)+CE | 32,5±10,4 | 30,6±7,2 |
| Pam3CSK4 | 34,2±16,5 | 30,9±12,6 |
| Pam3CSK4+ES | 33,5±19,2 | 31,8±14,2 |
| Pam3CSK4+CE | 31,1±12,9 | 30,6±8,9 |
| HKLM | 33,6±16,7 | 31±10 |
| HKLM+ES | 37,1±13,6 | 34,5±8,4 |
| HKLM+CE | 32,6±15 | 29,7±7,2 |
| Poly (I:C) | 43,8±11,2 | 32,5±7,6 |
| Poly (I:C)+ES | 42,6±19,9 | 34,5±10,7 |
| Poly (I:C)+CE | 35,6±20,5 | 31,6±8,5 |
| Poly (I:C) LMW | 36±24,7 | 31,6±10,2 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 36,2±21,7 | 34,3±14 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 41,2±22,1 | 39,8±17,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 35,3±8,9 | 28,5±6,3 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 42,9±11,8 | 29,9±6,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 39,9±10,3 | 30,3±7,8 |
| ST-FLA | 43,4±24,5 | 46,8±29,5 |
| ST-FLA+ES | 41±24,1 | 39,8±16,9 |
| ST-FLA+CE | 19,1±15,9 | 28,9±4,6 |

Tras 12 h de estimulación, la población CD11c- Myd88+ no se vio modificada por ES, pero sí por CE, el cual la incrementó respecto al control sin estimular. La estimulación con los ligandos de los TLR en solitario originó un incremento de dicha población en todos los casos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* K12, así como de ES con HKLM, y de CE con Poly (I:C) LMW, dio lugar a un incremento en la población CD11c- Myd88+ respecto a estos ligandos en solitario. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para ES o CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 en solitario ($p=0,023$ y $p=0,018$, respectivamente) (Figura 109).

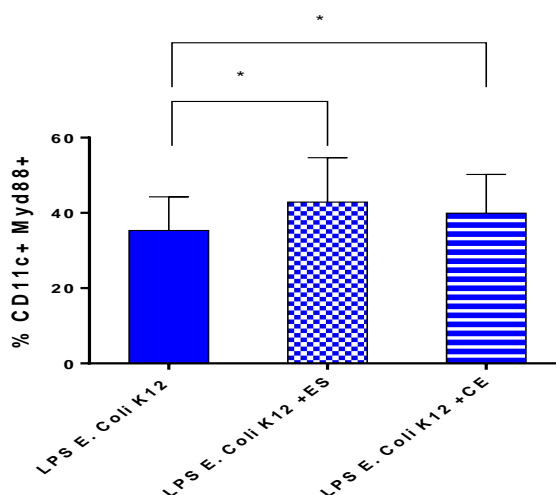


Figura 109. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,023$, $p=0,018$, respectivamente).

Por otro lado, la asociación de ES con CpG (ODN1826), así como de CE con Poly (I:C) y ST-FLA, disminuyó la población CD11c- Myd88+ respecto a estos ligandos en solitario.

En cuanto a los cambios producidos en la expresión intracelular de Myd88 en células CD11c-, la estimulación con ES no dio lugar a cambio alguno, mientras que CE la incrementó respecto al control negativo. La estimulación tampoco mostró modificaciones respecto al control negativo. Solo en presencia de ST-FLA la expresión de Myd88 aumentó respecto al control sin estimular.

La asociación de ES o CE con los diferentes ligandos no dio lugar a cambios en la expresión de Myd88 respecto a los ligandos en solitario en la mayoría de los casos. Solo en los casos concretos de CpG (ODN1826) y ST-FLA se originó un descenso en la expresión intracelular de Myd88. Dicho descenso fue estadísticamente significativo para CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,035$) (Figura 110).

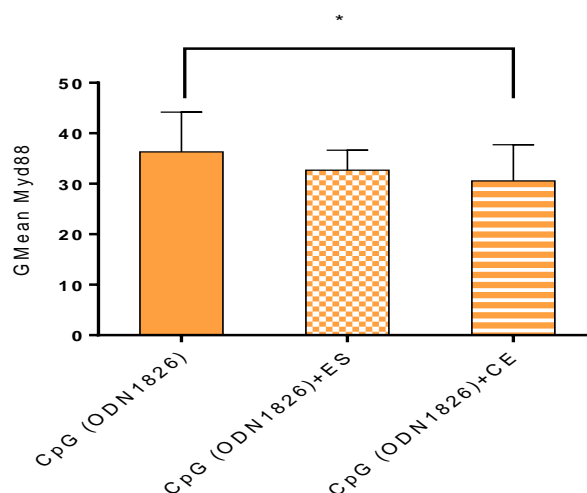


Figura 110. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,035$).

2.2.12. Efecto de los antígenos ES y CE sobre la estimulación ejercida por los ligandos de TLR sobre la expresión intracelular del factor de transcripción NF- κ B

La expresión intracelular del factor de transcripción NF- κ B se testó tras 12 h de estimulación. Además, se incluyeron los datos obtenidos al estimular con CpG (ODN1826) y LPS *E. coli* 026B6, aparte del resto que se venían ensayando hasta ahora.

En primer lugar, se analizó la población CD11c+ NF- κ B+. En la Tabla 82 se recogen los resultados obtenidos.

La presencia de ES disminuyó la población CD11c+ NF- κ B+ respecto al control sin estimular, mientras que CE no dio lugar a cambios. La estimulación con los ligandos de los TLR aumentó dicha población respecto al control negativo, con las excepciones de HKLM, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que o bien no la modificaron, o bien la disminuyeron.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c+ NF- κ B+ respecto a los ligandos en solitario, en los siguientes casos: LPS *E. coli* 026B6, Pam3CSK4 y Poly (I:C) LMW. Por el contrario, la asociación de ES o CE con CpG (ODN1826) y ST-FLA la disminuyeron respecto a estos ligandos en solitario. En el caso de CE en combinación con CpG (ODN1826) el descenso fue estadísticamente significativo respecto a CpG (ODN1826) individualmente ($p=0,033$) (Figura 111).

Tabla 82. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ NF- κ B+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de NF- κ B en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | NF- κ B (%) | NF- κ B (GMean) |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Control | 52,2 \pm 18,7 | 84,2 \pm 49 |
| ES | 46,1 \pm 9,5 | 75,2 \pm 32,6 |
| CE | 50,8 \pm 14,6 | 69,6 \pm 48,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 50,8 \pm 23,3 | 43 \pm 9,3 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 64,3 \pm 33,8 | 104,8 \pm 68,1 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 63,6 \pm 36,1 | 95,5 \pm 59,8 |
| CpG (ODN1826) | 70 \pm 31,3 | 104,2 \pm 71,2 |
| CpG (ODN1826) +ES | 65,5 \pm 35,3 | 146,4 \pm 149,4 |
| CpG (ODN1826) +CE | 54,3 \pm 28,9 | 53,7 \pm 20,3 |
| Pam3CSK4 | 58,8 \pm 23,4 | 93,8 \pm 77,2 |
| Pam3CSK4+ES | 61,1 \pm 27,9 | 100,6 \pm 68,2 |
| Pam3CSK4+CE | 61,7 \pm 30,8 | 92 \pm 57,7 |
| HKLM | 47,1 \pm 28 | 89,2 \pm 61 |
| HKLM+ES | 44,8 \pm 27 | 85 \pm 28,5 |
| HKLM+CE | 49,2 \pm 22,9 | 84,9 \pm 48,8 |
| Poly (I:C) | 39,8 \pm 22,7 | 61,3 \pm 15,1 |
| Poly (I:C) +ES | 40,1 \pm 19,1 | 64,6 \pm 34 |
| Poly (I:C) +CE | 43,3 \pm 19,6 | 65,6 \pm 26,2 |
| Poly (I:C) LMW | 35,1 \pm 20,8 | 63,4 \pm 23,4 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 39 \pm 13,3 | 57,2 \pm 16,8 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 39,1 \pm 13,6 | 58,9 \pm 19,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 66,5 \pm 14,4 | 99,3 \pm 79,6 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 63,6 \pm 17,2 | 97,2 \pm 70,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 60,3 \pm 21,7 | 97,4 \pm 70,4 |
| ST-FLA | 46,5 \pm 6,5 | 54,9 \pm 20,3 |
| ST-FLA+ES | 41,8 \pm 12,4 | 54,2 \pm 19,5 |
| ST-FLA+CE | 40,5 \pm 18,8 | 63,2 \pm 30 |

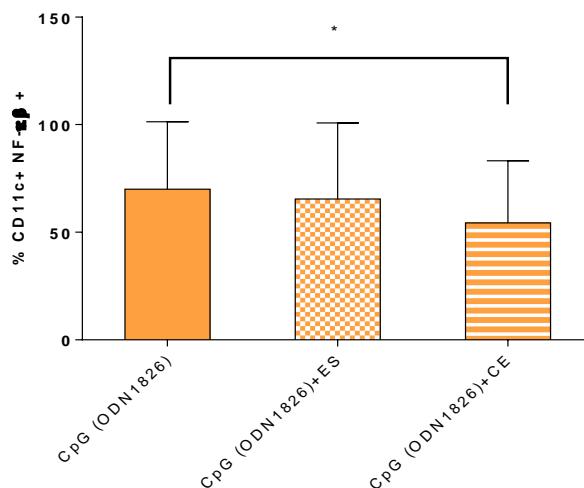


Figura 111. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ NF-κβ+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,033$).

En cuanto a la expresión intracelular de NF-κβ en la población CD11c+ NF-κβ+, la presencia de ES y CE la disminuyó respecto al control negativo. La estimulación con los ligandos de los TLR dio lugar a respuestas encontradas. LPS *E. coli* 026B6, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA disminuyeron la expresión de NF-κβ respecto al control, mientras que CpG (ODN1826), Pam3CSK4, HKLM y LPS *E. coli* K12 la incrementaron.

La asociación con ES o CE de los ligandos de los TLR dio lugar a pocos cambios en la expresión intracelular de la NF-κβ respecto a los ligandos en solitario. Sin embargo, se apreció un descenso en dicha expresión al asociar ES o CE con Poly (I:C) LMW, así como al combinar CE con CpG (ODN1826). Por el contrario, la combinación de LPS *E. coli* 026B6 con ES o CE la incrementó.

En segundo lugar, se analizó la población CD11c- NF-κβ+. Los resultados se muestran en la Tabla 83.

La presencia de ES y CE en solitario no originó cambios en la población CD11c- NF-κβ+ respecto al control sin estimular, mientras que la estimulación con los ligandos de los TLR aumentó dicha población, con las excepciones de LPS *E. coli* 026B6, HKLM, Poly (I:C), Poly (I:C) LMW y ST-FLA que, o bien no la modificaron, o bien la disminuyeron respecto al control sin estimular.

La asociación de ES o CE con cada uno de los ligandos ocasionó un incremento en el porcentaje de células CD11c- NF-κβ+ respecto a los ligandos en solitario para LPS *E. coli* 026B6, HKLM y Poly (I:C) LMW, pero presentó el efecto contrario la asociación de CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario. La asociación de ES o CE con el resto de ligandos no dio lugar a cambios importantes en la población CD11c- NF-κβ+.

Finalmente, la expresión intracelular de NF-κβ en la población CD11c- NF-κβ+ se vio disminuida en presencia de ES y CE respecto al control. De igual modo, la estimulación con los ligandos de los TLR la disminuyeron respecto al control en todos los casos.

La asociación con ES o CE de los ligandos de los TLR, en general, originó un incremento en la expresión de NF- κ B respecto a cada uno de los ligandos en solitario, especialmente en el caso de LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* K12, Pam3CSK4 y Poly (I:C).

Tabla 83. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- NF- κ B+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de NF- κ B en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| | NF- κ B (%) | NF- κ B (GMean) |
|------------------------------------|--------------------|------------------------|
| Control | 11,5 \pm 3,9 | 59,4 \pm 24,2 |
| ES | 9,2 \pm 4 | 56,4 \pm 20,2 |
| CE | 11,3 \pm 2,2 | 48,4 \pm 22,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 10,3 \pm 6,3 | 35,8 \pm 6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 27,8 \pm 24,7 | 50,9 \pm 16,6 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 28,2 \pm 28 | 51,4 \pm 14,2 |
| CpG (ODN1826) | 32,2 \pm 30,3 | 53,3 \pm 17,6 |
| CpG (ODN1826) +ES | 30,8 \pm 33 | 51,6 \pm 17,7 |
| CpG (ODN1826) +CE | 9,7 \pm 5,9 | 42,2 \pm 10,1 |
| Pam3CSK4 | 14,8 \pm 7 | 44,3 \pm 25,6 |
| Pam3CSK4+ES | 17,6 \pm 9 | 49,8 \pm 23,5 |
| Pam3CSK4+CE | 15,8 \pm 9,9 | 49,4 \pm 24,6 |
| HKLM | 8,8 \pm 5,1 | 49,1 \pm 24 |
| HKLM+ES | 10,1 \pm 9,4 | 51,4 \pm 20,5 |
| HKLM+CE | 12,4 \pm 9,9 | 49,4 \pm 21,1 |
| Poly (I:C) | 10,7 \pm 4,6 | 45,7 \pm 14,6 |
| Poly (I:C) +ES | 8,8 \pm 4,6 | 50,5 \pm 25,3 |
| Poly (I:C) +CE | 13,7 \pm 9,2 | 51,3 \pm 22,8 |
| Poly (I:C) LMW | 8,6 \pm 6,1 | 49,8 \pm 21,8 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 10 \pm 1,6 | 44,1 \pm 13,5 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 12,7 \pm 6 | 48,4 \pm 17,8 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 15,1 \pm 5,1 | 44,5 \pm 24 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 15,8 \pm 6,1 | 45,9 \pm 23 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 16,4 \pm 6,9 | 52 \pm 28,4 |
| ST-FLA | 12,4 \pm 4,8 | 46,7 \pm 18,7 |
| ST-FLA+ES | 11,5 \pm 4,7 | 47,1 \pm 16,3 |
| ST-FLA+CE | 11,3 \pm 10,2 | 48,6 \pm 23,4 |

3. EFECTO DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

Se determinaron los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de BMDDCs tras 48 h de estimulación con los antígenos larvarios de *A. simplex* y/o los ligandos de TLR. Se realizó tanto en cepas de ratón BALB/c como C57BL/6, tal y como queda descrito en el apartado de Materiales y Métodos correspondiente.

De este modo, se estudió la producción de IL-10 por ES y CE en solitario respecto al control y, de forma paralela, cómo afectaron ES y CE a la respuesta provocada por cada uno de los agonistas de los TLR en solitario, al asociarlos en el cultivo.

Por último, si bien todo esto se realizó para ambas cepas de ratón, en el caso concreto de la cepa C57BL/6 los ligandos ST-FLA y ssARN 40 no se testaron.

A continuación, se describen los resultados obtenidos.

3.1. Estudio del efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c

Las BMDDCs se estimularon tras 6 días de maduración con ES o CE en solitario y en combinación con los ligandos de los TLR durante 48 h. Siempre se contó con un control negativo sin estimular. Transcurridas las 48 h estipuladas, se recogieron los sobrenadantes y se determinó mediante ELISA la concentración de IL-10 (pg/ml) en cada uno de ellos. En la Tabla 84 se muestran los resultados obtenidos.

Como puede observarse, de forma general, solo ES y CE disminuyeron la concentración media de IL-10 presente en el sobrenadante celular respecto al control sin estimular, mientras que todos los agonistas de los TLR incrementaron dicha citocina. LPS *E. coli* 026B6, HKLM y LPS *E. coli* K12 fueron los ligandos que, en solitario, dieron lugar a un mayor incremento de la IL-10 respecto al control negativo.

En la Figura 112 se pueden apreciar de una manera más gráfica y visual los datos recogidos en la Tabla 84, en comparación con el control.

Tabla 84. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (pg/ml) |
|-----------------------------|---------------|
| Control | 102,7±25,9 |
| ES | 61±14,1 |
| CE | 94,3±42,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 497,7±42,4 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 524,3±37,7 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 406±190,9 |
| CpG (ODN1826) | 104,3±23,6 |
| CpG (ODN1826)+ES | 82,7±68,4 |
| CpG (ODN1826)+CE | 66±2,4 |
| Pam3CSK4 | 136±11,8 |
| Pam3CSK4+ES | 132,7±7,1 |
| Pam3CSK4+CE | 101±4,7 |
| HKLM | 831±94,3 |
| HKLM+ES | 156±11,8 |
| HKLM+CE | 146±16,5 |
| Poly (I:C) | 117,7±33 |
| Poly (I:C)+ES | 86±7,1 |
| Poly (I:C)+CE | 476±143,8 |
| Poly (I:C) LMW | 126±7,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 149,3±35,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 94,3±18,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 302,7±25,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 332,7±16,5 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 219,3±58,9 |
| ST-FLA | 127,7±14,1 |
| ST-FLA+ES | 139,3±44,8 |
| ST-FLA+CE | 369,3±87,2 |
| FSL-1 | 469,3±82,5 |
| FSL-1+ES | 134,3±23,6 |
| FSL-1+CE | 116±11,8 |
| ssARN 40 | 121±23,6 |
| ssARN 40+ES | 224,3±89,6 |
| ssARN 40+CE | 119,3±11,8 |

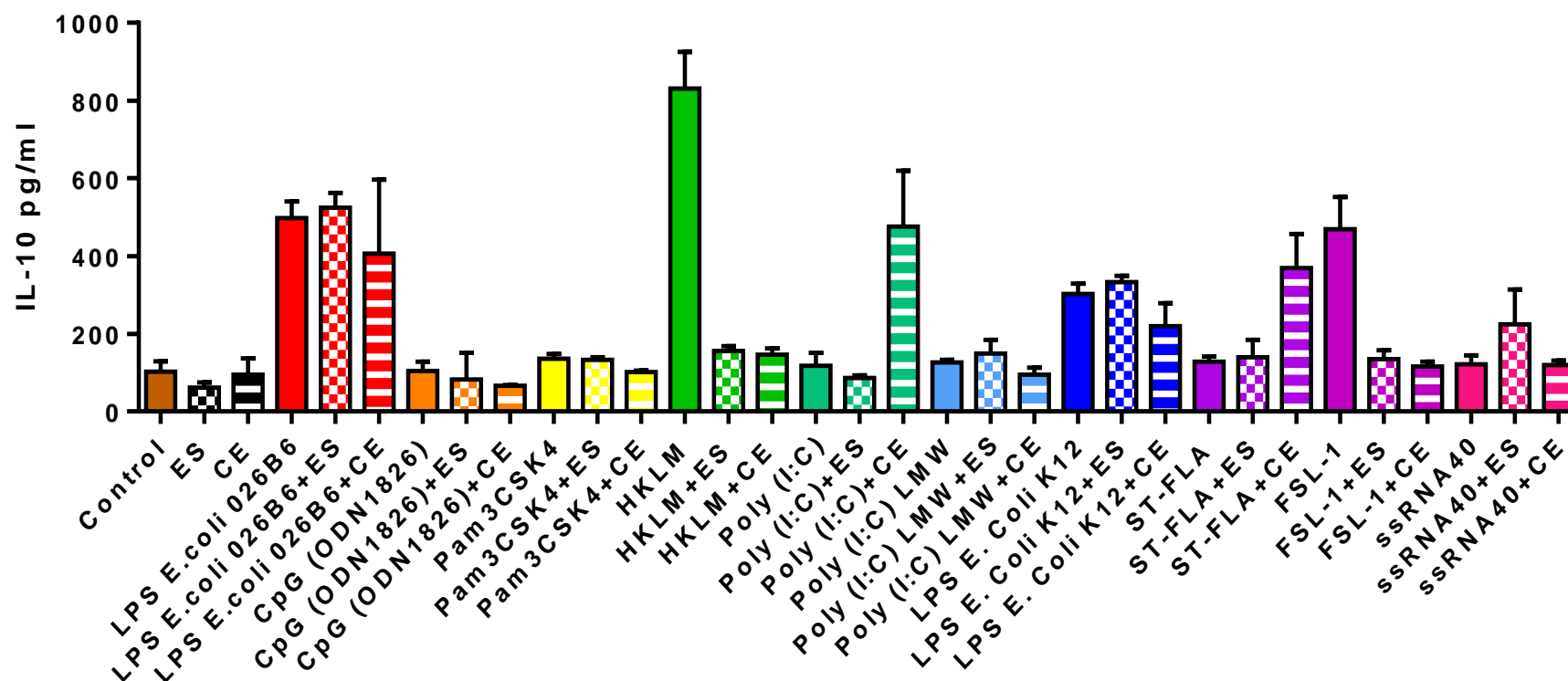


Figura 112. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación.

A continuación, se realizará una descripción de los resultados recogidos en la Tabla 84 y Figura 112 más detalladamente, incluyendo las diferencias estadísticamente significativas encontradas.

En primer lugar, se analizaron las diferencias existentes entre el control y aquellas BMDDCs incubadas en presencia de ES o CE. En ambos casos, la producción de IL-10 fue menor respecto al control negativo, especialmente en el caso de ES (Figura 113).

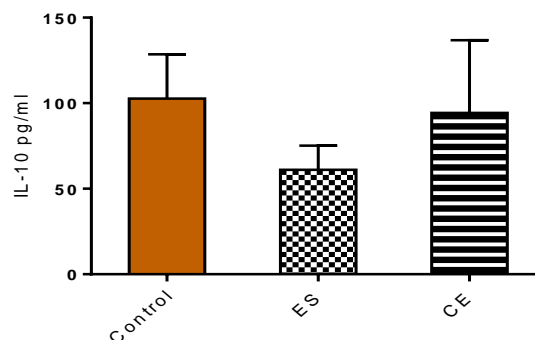


Figura 113. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En segundo lugar, se estudió el cambio en la producción de IL-10 por BMDDCs entre aquellas estimuladas por los agonistas de los TLR individualmente y aquellas estimuladas con estos combinados con con ES o CE.

La estimulación con LPS *E. coli* 026B6 incrementó claramente la concentración media de IL-10 respecto al control negativo. La asociación con ES la aumentó aún más, mientras que la combinación con CE la disminuyó respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario (Figura 114).

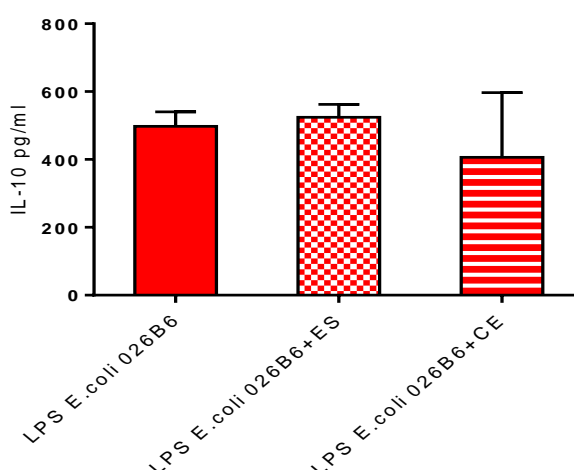


Figura 114. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La estimulación con CpG (ODN1826) apenas incrementó la producción de IL-10 respecto al control negativo y su asociación con ES o CE disminuyó dicha producción respecto a CpG (ODN1826) solo, especialmente al combinarse con CE (Figura 115).

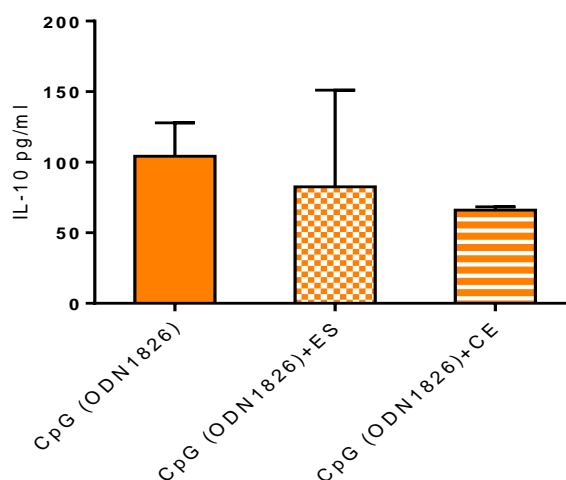


Figura 115. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por su parte, la estimulación con Pam3CSK4 promovió una mayor producción de IL-10 respecto al control sin estimular. Sin embargo, su asociación con ES o CE presentó el efecto contrario, sobre todo al combinarse con CE, respecto a Pam3CSK4 en solitario (Figura 116).

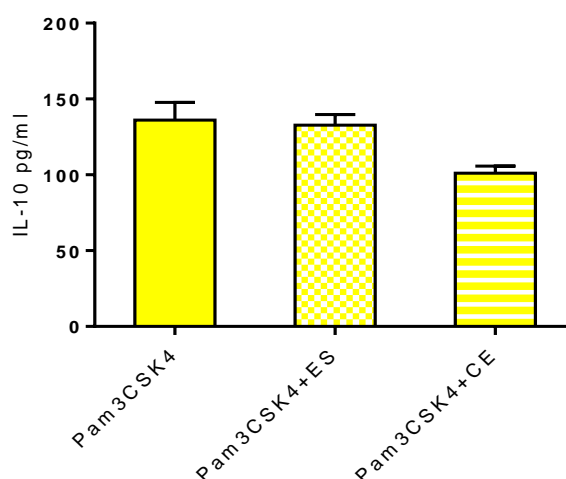


Figura 116. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La estimulación con HKLM dio lugar al mayor incremento de todos en la concentración media de IL-10 en los sobrenadantes respecto al control negativo. Por el

contrario, su asociación tanto con ES como CE originó un descenso drástico en dicha producción respecto a HKLM en solitario, que fue estadísticamente significativo en ambos casos ($p<0,0001$ y $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 117).

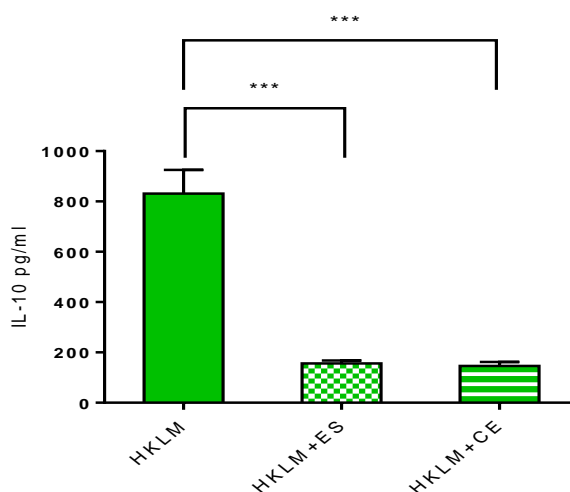


Figura 117. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo, tanto para ES como para CE en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p<0,0001$ y $p<0,0001$, respectivamente).

Por otro lado, la estimulación con Poly (I:C) ocasionó un suave incremento en la producción de IL-10 respecto al control sin estimular, que se incrementó considerablemente al combinar Poly (I:C) con CE respecto a Poly (I:C) en solitario. Dicho incremento fue estadísticamente significativo ($p<0,0001$) (Figura 118). La combinación de ES con Poly (I:C) disminuyó levemente la producción de IL-10 respecto a Poly (I:C) en solitario.

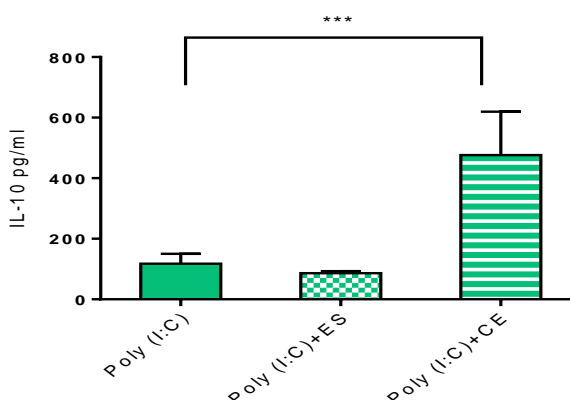


Figura 118. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para CE en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p<0,0001$).

La estimulación con Poly (I:C) LMW presentó un incremento leve en la producción de IL-10 respecto al control negativo, que se vio potenciado al asociarse Poly (I:C) con ES

respecto a Poly (I:C) LMW individualmente. La combinación con CE presentó el efecto contrario (Figura 119).

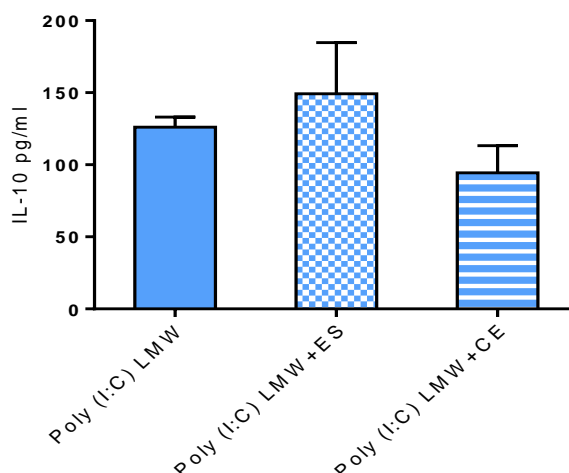


Figura 119. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Así mismo, al igual que ocurrió en presencia de LPS *E. coli* 026B6, la estimulación de las BMDDCs con LPS *E. coli* K12 incrementó de forma notoria la producción de IL-10 respecto al control negativo. Su asociación con ES lo acrecentó respecto a LPS *E. coli* 026K12 individualmente, mientras que la combinación con CE originó el efecto contrario (Figura 120).

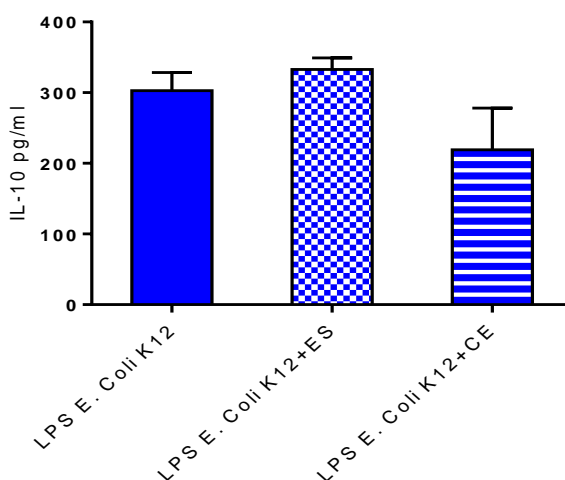


Figura 120. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La estimulación con ST-FLA apenas incrementó la producción de IL-10 respecto al control sin estimular, y su asociación con ES dio lugar a valores muy similares respecto a ST-FLA solo. Sin embargo, la asociación de ST-FLA con CE ocasionó un aumento en

la producción de IL-10 que fue estadísticamente significativo respecto a ST-FLA solo ($p<0,05$) (Figura 121).

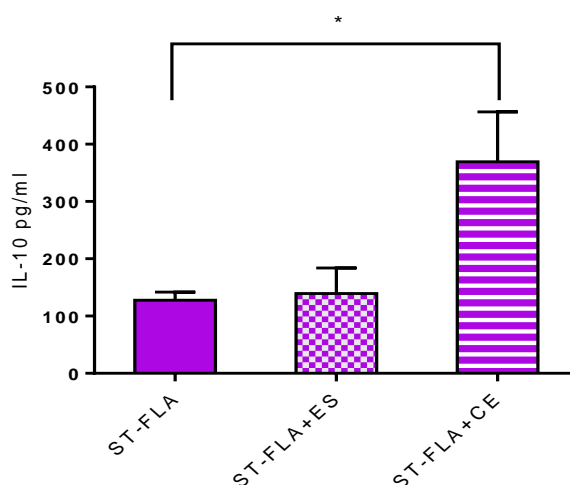


Figura 121. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para CE en combinación con ST-FLA respecto a solo ST-FLA ($p<0,05$).

Las BMDDCs incubadas en presencia de FSL-1 solo produjeron una concentración de IL-10 notoriamente superior a la del control. Por el contrario, la asociación de ST-FLA tanto con ES como con CE, originó un descenso que fue estadísticamente significativo respecto a FSL-1 solo ($p<0,0001$, $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 122).

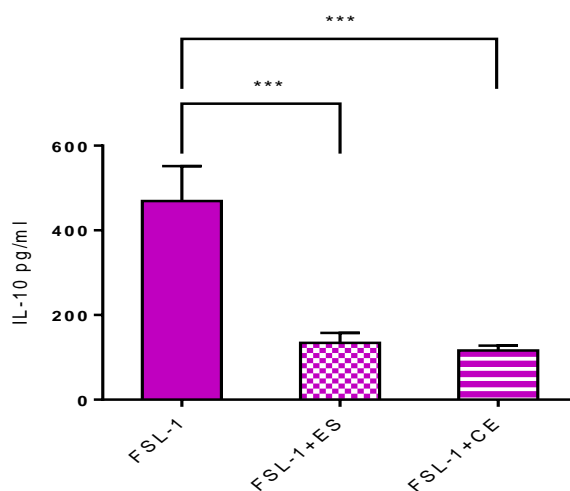


Figura 122. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo tanto para ES como para CE en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p<0,0001$ y $p<0,0001$, respectivamente).

Por último, la estimulación con ssARN 40 originó un ligero incremento en la concentración media de IL-10 respecto al control negativo, que se vio aumentado al

asociarse ssARN 40 con ES. La combinación de CE con ssARN 40 no dio lugar a cambios (Figura 123).

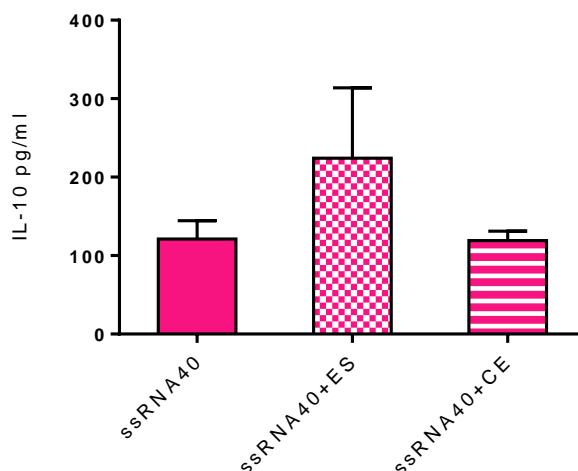


Figura 123. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En resumen, la combinación de ES con los ligandos de los TLR originó un incremento importante en la producción de IL-10 para LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* 026K12, Poly (I:C) LMW, ST-FLA y ssARN 40 respecto a los ligandos en solitario. Por el contrario, redujo de forma significativa la producción de IL-10 al combinarse con HKLM, Poly (I:C) y FSL-1.

Por su parte, la asociación de los ligandos con CE ocasionó en la mayoría de los casos una tendencia hacia el descenso en la producción de IL-10 respecto a los ligandos en solitario, que fue significativo respecto HKLM y FSL-1 en solitario. Por el contrario, la asociación de CE con Poly (I:C) y ST-FLA dio lugar a un aumento significativo de la IL-10 respecto a estos dos ligandos en solitario.

3.2. Estudio del efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6

Las BMDDCs se estimularon tras 6 días de maduración con solo ES o CE o en combinación con los ligandos de los TLR durante 48 h. Siempre se contó con un control negativo de BMDDCs sin estimular, que se incubaron bajo las mismas condiciones. Transcurridas las 48 h, se recogieron los sobrenadantes y se determinó mediante ELISA la concentración de IL-10 (pg/ml) en cada uno de ellos. En la Tabla 85 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 85. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Los datos en tojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | IL-10 (pg/ml) |
|-----------------------------|---------------|
| Control | 46,8±10,6 |
| ES | 77,7±18,9 |
| CE | 101±33 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6 | 3649,3±535 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+ES | 5136±289,9 |
| LPS <i>E. coli</i> 026B6+CE | 3954,3±297 |
| CpG (ODN1826) | 572,7±308,8 |
| CpG (ODN1826)+ES | 2589,3±195,6 |
| CpG (ODN1826)+CE | 979,3±73,1 |
| Pam3CSK4 | 136±54,2 |
| Pam3CSK4+ES | 9,3±2,4 |
| Pam3CSK4+CE | 62,7±2,4 |
| HKLM | 12,7±7,1 |
| HKLM+ES | 22,7±25,9 |
| HKLM+CE | 82,7±40,1 |
| Poly (I:C) | 47,7±18,9 |
| Poly (I:C)+ES | 142,7±190,9 |
| Poly (I:C)+CE | 12,7±7,1 |
| Poly (I:C) LMW | 37,7±14,1 |
| Poly (I:C) LMW+ES | 6±2,4 |
| Poly (I:C) LMW+CE | 32,7±2,4 |
| LPS <i>E. coli</i> K12 | 2799,3±91,9 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+ES | 2792,7±40,1 |
| LPS <i>E. coli</i> K12+CE | 2507,7±117,9 |
| ST-FLA | 14,3±4,7 |
| ST-FLA+ES | 32,7±21,2 |
| ST-FLA+CE | 24,3±9,4 |

Además, en la Figura 124 se pueden apreciar de una manera más gráfica y visual todos los datos recogidos en la Tabla 85, respecto al control negativo. A primera vista, se puede apreciar que los ligandos LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* K12 y CpG (ODN1826) originaron un incremento drástico en la producción de IL-10 respecto al control sin estimular.

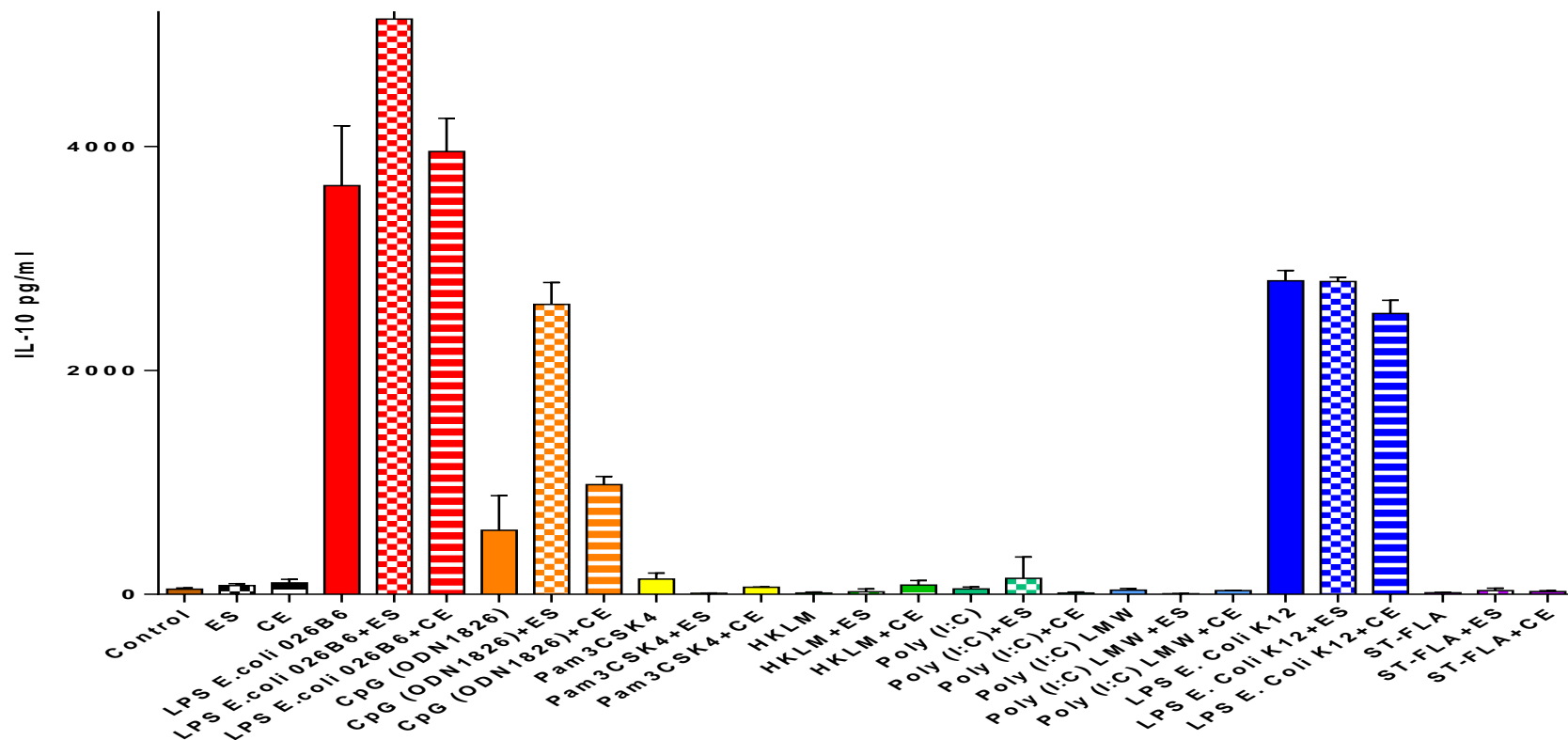


Figura 124. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación.

A continuación, se realizará una descripción más detallada de los resultados recogidos en la Tabla 85 y Figura 124, incluyendo las diferencias estadísticamente significativas encontradas.

En primer lugar, se analizaron las diferencias existentes entre el control sin estimular y aquellas BMDDCs incubadas en presencia de ES o CE. En ambos casos, la producción de IL-10 fue superior a la del control negativo, especialmente en el caso de CE (Figura 125).

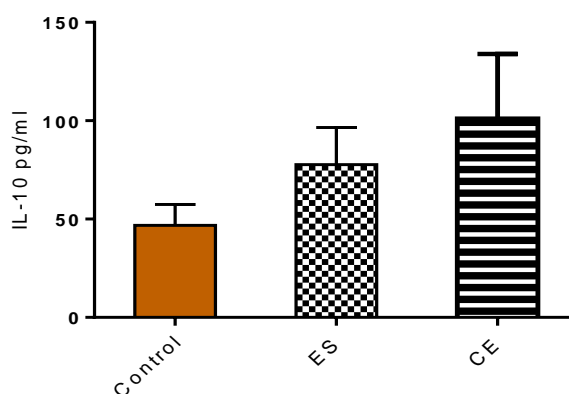


Figura 125. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En segundo lugar, la estimulación con LPS *E. coli* 026B6 incrementó claramente la concentración media de IL-10 respecto al control. La asociación con ES o CE la aumentaron aún más respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p < 0,0001$) (Figura 126).

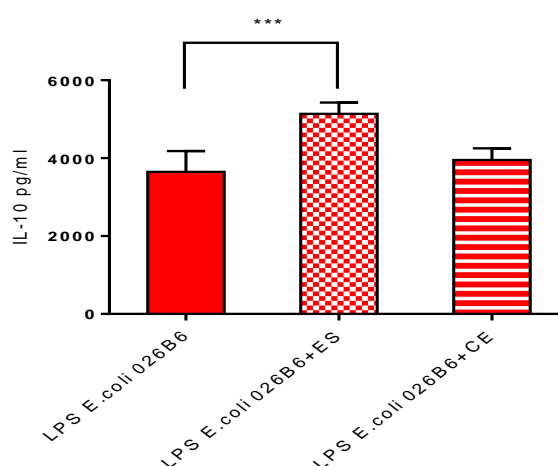


Figura 126. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p < 0,0001$).

La estimulación con CpG (ODN1826) también dio lugar a un incremento considerable en la producción de IL-10 respecto al control sin estimular. Su asociación tanto con ES como con CE potenció dicha producción respecto a CpG (ODN1826) individualmente, siendo estadísticamente significativo al combinarse con ES ($p<0,0001$) (Figura 127).

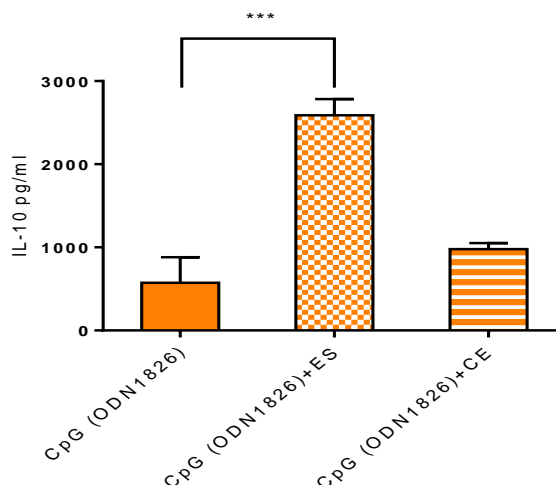


Figura 127. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p<0,0001$).

Por su parte, la estimulación con Pam3CSK4 promovió una mayor producción de IL-10 respecto al control negativo. Sin embargo, su asociación ES o CE presentó el efecto contrario, sobre todo al combinarse con ES, respecto a Pam3CSK4 solo (Figura 128).

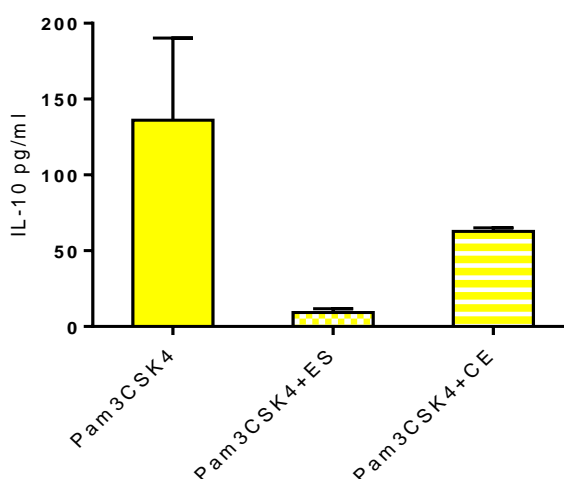


Figura 128. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Las BMDDCs incubadas en presencia de HKLM experimentaron una reducción en la producción de IL-10 respecto al control negativo. Por el contrario, su asociación tanto

con ES como CE originó un aumento en dicha producción respecto a HKLM solo (Figura 129).

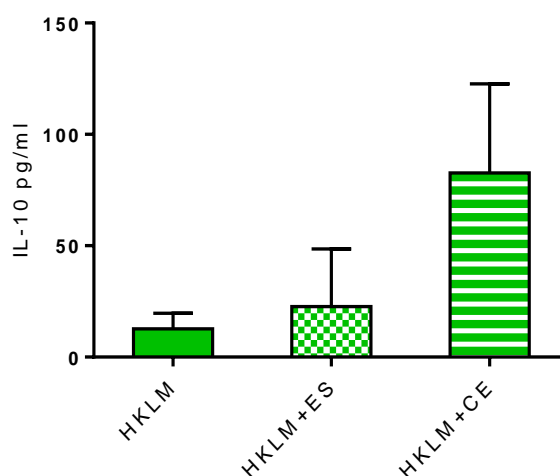


Figura 129. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La estimulación con Poly (I:C) no produjo cambios en la producción de IL-10 respecto al control negativo, pero, su asociación con ES la incrementó respecto a solo Poly (I:C), mientras que con CE dio lugar al efecto contrario (Figura 130).

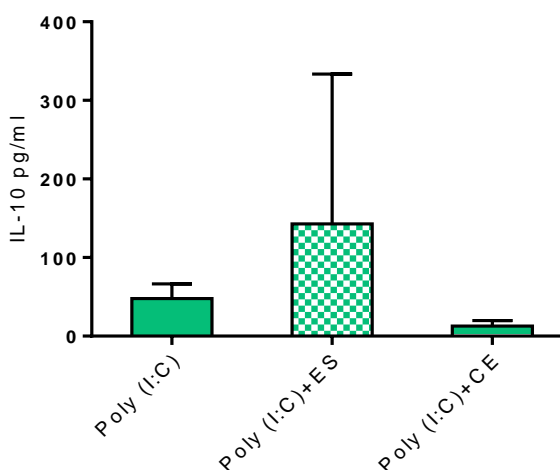


Figura 130. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La estimulación con Poly (I:C) LMW redujo la producción de IL-10 respecto al control negativo, lo cual se vio acrecentado al asociar Poly (I:C) LMW tanto con ES como con CE respecto a Poly (I:C) LMW solo (Figura 131).

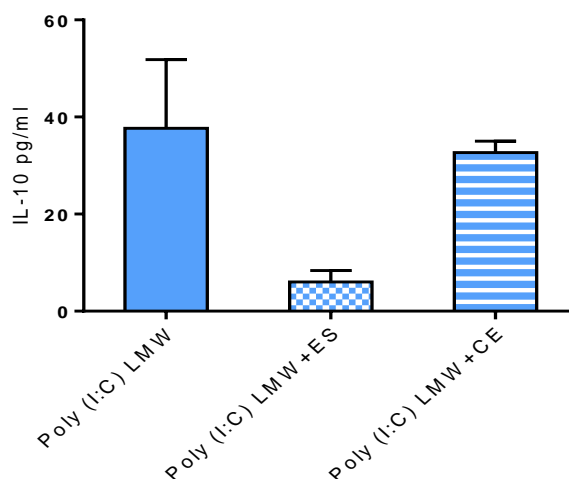


Figura 131. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Así mismo, al igual que ocurrió en presencia de LPS *E. coli* 026B6, la estimulación de las BMDDCs con LPS *E. coli* K12 incrementó drásticamente la producción de IL-10 respecto al control sin estimular. Por su parte, la asociación con ES no modificó la producción de IL-10 ocasionada por LPS *E. coli* 026B6, pero la combinación con CE la disminuyó levemente (Figura 132).

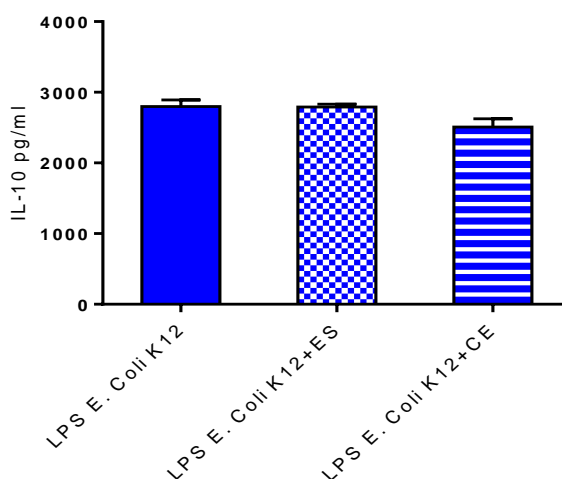


Figura 132. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, las BMDDCs estimuladas con ST-FLA experimentaron un descenso en la producción de IL-10 respecto al control negativo. Por el contrario, la asociación de ST-FLA, tanto con ES como con CE, incrementó la IL-10 respecto a ST-FLA en solitario (Figura 133).

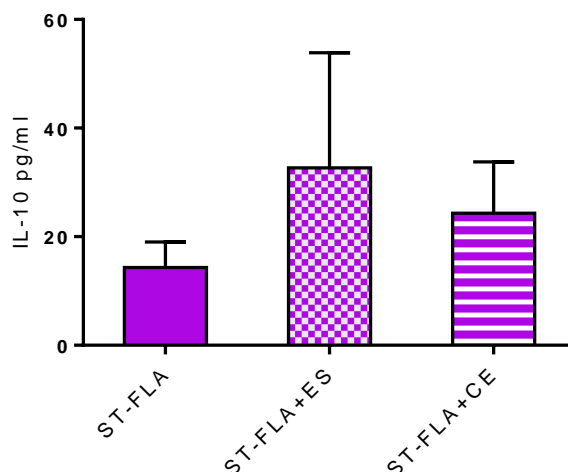


Figura 133. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

A modo de resumen, la combinación de ES con los ligandos de los TLR originó un incremento significativo en la producción de IL-10 en el caso concreto de LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) respecto a los ligandos en solitario. Mientras que redujo de forma importante la producción de IL-10 al combinarse con Pam3CSK4 y Poly (I:C) LMW.

Por su parte, la asociación de los ligandos con CE ocasionó una respuesta muy similar a la combinación con ES, con la diferencia de que no incrementó la producción de IL-10 al combinarse con Poly (I:C), sino que originó una tendencia decreciente. Lo mismo sucedió al combinar CE con LPS *E. coli* K12.

3.3. Estudio del efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la producción de IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón: comparación de los resultados obtenidos en las cepas de ratón BALB/c y C57BL/6

Una vez descritos todos los datos obtenidos en lo que se refiere a la producción de IL-10 por BMDDCs estimuladas durante 48 h por los antígenos larvarios de *A. simplex* y/o los ligandos de los TLR, nos resultó de especial interés comparar las respuestas desarrolladas en ambas cepas de ratón: BALB/c y C57BL/6.

En primer lugar, la producción basal de IL-10 por las BMDDCs sin estimular (control) fue superior en los ratones BALB/c en comparación con la cepa C57BL/6. Así mismo, mientras que ES y CE disminuyeron la producción de IL-10 respecto al control en el caso de los ratones BALB/c, en la cepa C57BL/6 se produjo el efecto opuesto (Figura 134).

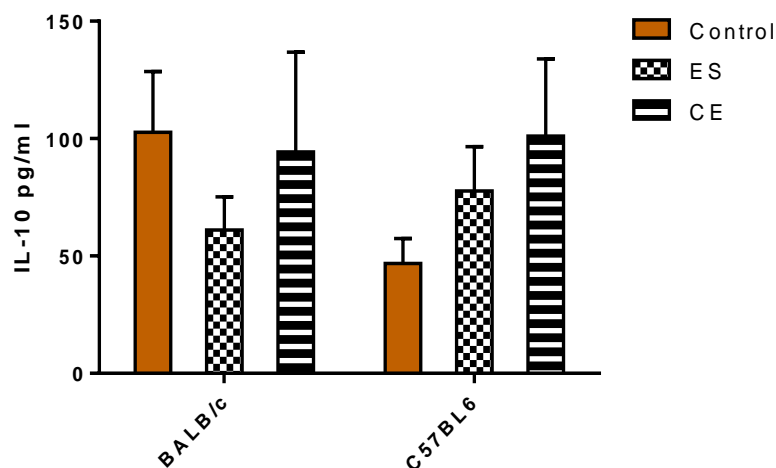


Figura 134. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, si bien en ambas cepas la estimulación con LPS *E. coli* 026B6 solo originó un aumento de la IL-10 muy superior al del control, dicho incremento fue significativamente mayor en los ratones C57BL/6 respecto a los BALB/c, en todos los casos ($p < 0,0001$) (Figura 135).

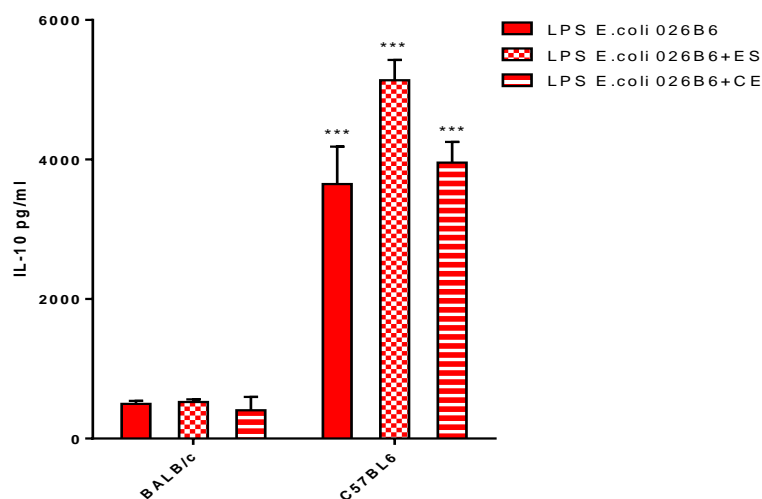


Figura 135. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* 026B6 + ES y LPS *E. coli* 026B6 + CE en ratones C57BL/6 fue significativamente superior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p < 0,0001$ en todos los casos).

Además, la asociación de LPS *E. coli* 026B6 con CE presentó efectos opuestos entre ambas cepas: en los ratones BALB/c redujo la producción de IL-10, mientras que en los C57BL/6 la incrementó respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario.

Por su parte, las BMDDCs de los ratones C57BL/6 experimentaron un incremento significativamente superior en la producción de IL-10 al ser estimuladas con CpG (ODN1826) (así como este asociado con ES o CE) respecto a los ratones BALB/c ($p<0,05$; $p<0,0001$; $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 136).

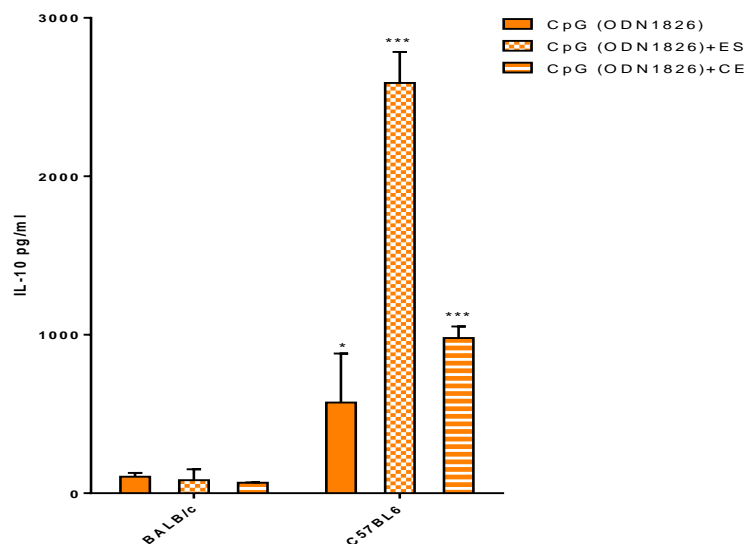


Figura 136. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de CpG (ODN1826), CpG (ODN1826)+ES y CpG (ODN1826)+CE en ratones C57BL/6 fue significativamente superior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p<0,05$; $p<0,0001$; $p<0,0001$, respectivamente).

Y no solo eso, si no que la estimulación con CpG (ODN1826) individualmente, así como asociado con ES o CE dio lugar a respuestas contrarias entre ambas cepas: en los ratones BALB/c disminuyó la producción de IL-10, mientras que en los C57BL/6 la incrementaron.

En cuanto a la estimulación de las BMDDCs con Pam3CSK4, solo y acompañado por ES o CE, la respuesta desarrollada en ambas cepas fue similar, como se puede apreciar en la Figura 137. Sin embargo, el descenso en la IL-10 originado por la asociación de ES o CE con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 en solitario fue claramente más marcado en los ratones C57BL/6.

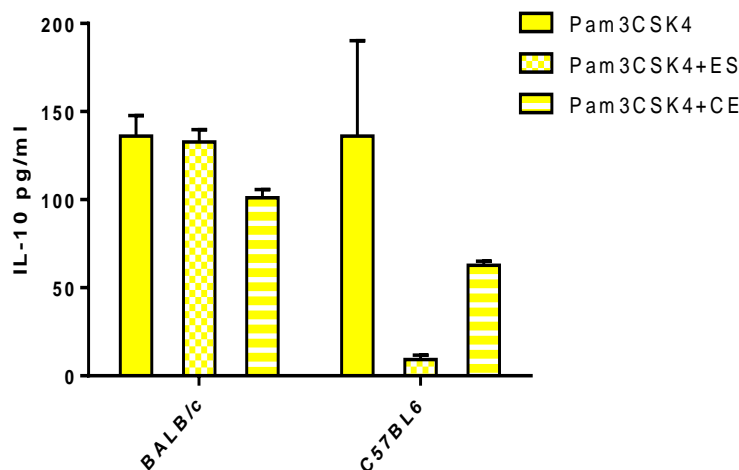


Figura 137. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, la estimulación con HKLM, así como su asociación con ES o CE, dio lugar a respuestas completamente opuestas entre las dos cepas (Figura 138).

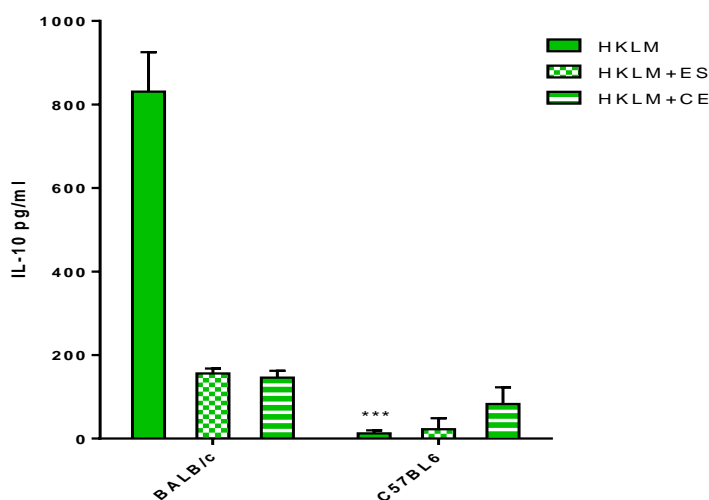


Figura 138. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de HKLM solo en ratones C57BL/6 fue significativamente inferior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p < 0,0001$).

Así, si en los ratones BALB/c la estimulación con HKLM en solitario incrementó con creces la producción de IL-10 respecto al control, en los ratones C57BL/6 ocurrió lo contrario. Igualmente, al asociar ES o CE con HKLM, se redujo la producción de IL-10 respecto a solo HKLM en los ratones BALB/c, mientras que en los C57BL/6 se incrementó.

Por último, la concentración media de IL-10 producida en presencia de solo HKLM en los ratones C57BL/6 fue significativamente inferior respecto a los ratones BALB/c ($p<0,0001$) (Figura 138).

Del mismo modo, la estimulación con Poly (I:C) individualmente, así como asociado a ES o CE, también originó respuestas contrarias entre ambas cepas, como se puede observar en la Figura 139.

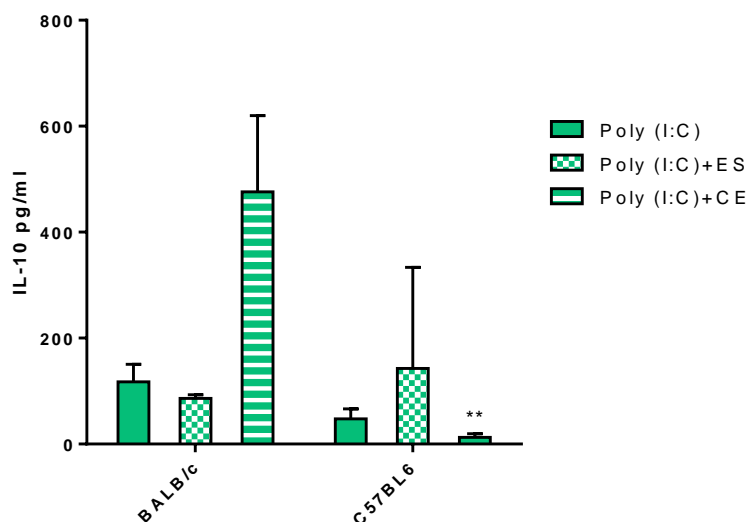


Figura 139. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de Poly (I:C) + CE en ratones C57BL/6 fue significativamente inferior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p<0,001$).

Además, la concentración media de IL-10 producida por las BMDDCs bajo la acción de Poly (I:C) asociado a CE fue significativamente superior en los ratones BALB/c respecto a los C57BL/6 ($p<0,0001$) (Figura 139).

Seguidamente, se comparó la respuesta desarrollada por ambas cepas en presencia de Poly (I:C) LMW. De nuevo, encontramos respuesta contrarias: si en los ratones BALB/c la estimulación con Poly (I:C) LMW en solitario dio lugar a un incremento respecto al control sin estimular, en los ratones C57BL/6 ocurrió lo contrario. La asociación de Poly (I:C) LMW con ES incrementó la IL-10 para los BALB/c y la disminuyó en los C57BL/6 respecto a Poly (I:C) LMW individualmente. Tan solo al combinar el ligando de TLR con CE, se obtuvo en ambos casos un descenso en la producción de la IL-10 respecto al ligando en solitario (Figura 140). Se destaca, además, que la concentración de IL-10 producida siempre fue inferior en los ratones C57BL/6 en comparación con los BALB/c.

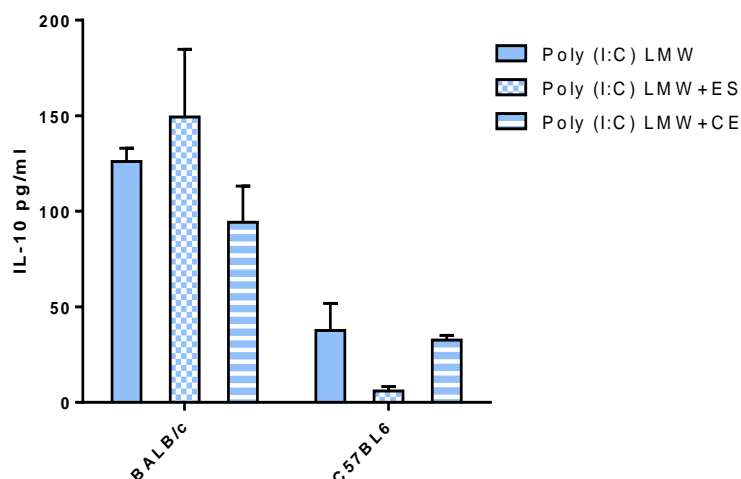


Figura 140. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La respuesta desarrollada frente a LPS *E. coli* K12 fue muy similar en ambas cepas de ratón. La principal diferencia fue la concentración media de IL-10 producida en cada caso testado (LPS *E. coli* 026B6 solo, con ES o con CE): fue significativamente superior en los ratones C57BL/6 respecto a los BALB/c ($p < 0,0001$) (Figura 141).

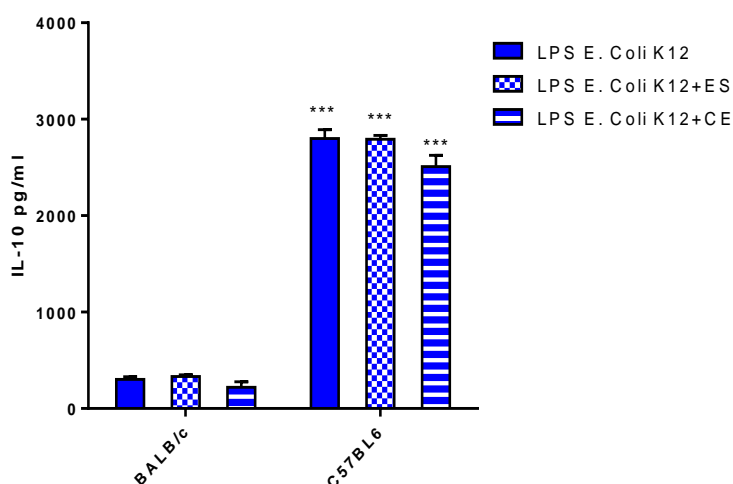


Figura 141. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. El aumento en la concentración media de IL-10 para LPS *E. coli* K12, LPS *E. coli* K12+ES y LPS *E. coli* K12+CE en ratones C57BL/6 fue estadísticamente significativo respecto a LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* 026B6+ES y LPS *E. coli* 026B6+CE, respectivamente, en ratones BALB/c ($p < 0,0001$ en todos los casos).

Finalmente, la estimulación con ST-FLA solo incrementó la producción de IL-10 respecto al control en los ratones BALB/c mientras que en los C57BL/6 la disminuyó. La combinación de ES o CE con ST-FLA dio lugar en ambas cepas de ratón a un incremento en la IL-10 respecto a ST-FLA solo. Eso sí, la concentración media de IL-10

fue considerablemente superior en los ratones BALB/c en todos los casos en comparación con los C57BL/6 (Figura 142).

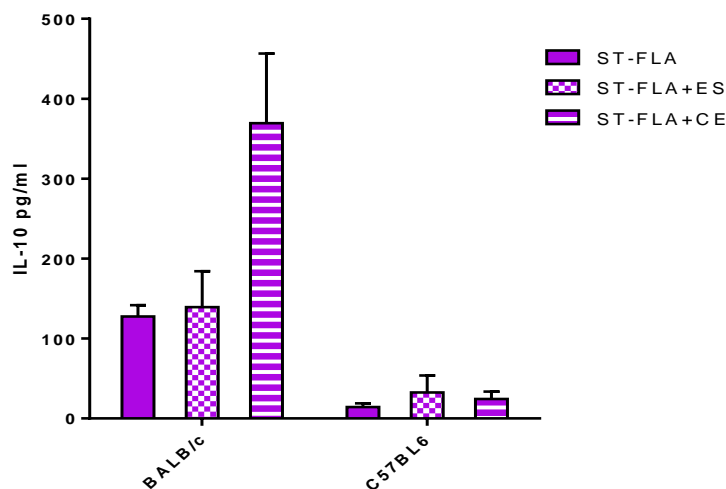


Figura 142. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Por tanto, después de todo lo descrito, podemos afirmar que la respuesta desarrollada por ambas cepas de ratón frente a los antígenos larvarios de *A. simplex*, así como a los agonistas de los TLR ensayados, fue opuesta en la mayoría de los casos. Más concretamente, bajo la acción de ES y CE en solitario, así como de LPS *E. coli* 026B6, CpG (ODN1826), HKLM, Poly (I:C) y Poly (I:C) LMW, solos y asociados con aquellos, y de ST-FLA individualmente. En el resto de casos ambas cepas de ratón originaron respuestas similares.

Por último, en la mayoría de los casos, la concentración media de IL-10 fue superior en los ratones BALB/c.

4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS CON LOS PRODUCTOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex* PARA GENERAR LINFOCITOS T REGULADORES EN RATONES BALB/c y C57BL/6

Se estudió el efecto *in vitro* de las BMDDCs previamente estimuladas con los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre linfocitos de bazo de ratones BALB/c y C57BL/6, siguiendo el protocolo previamente descrito en los apartados 3.2.2.1. (B) y 3.2.2.2. (B) de Materiales y Métodos de esta Tesis.

Tras 24 h de estimulación con ES y CE las BMDDCs se co-cultivaron con los esplenocitos previamente extraídos del bazo, durante 48 h. Se incluyó un control negativo de BMDDCs sin estimulación previa.

Mediante la CMF, se determinaron las moléculas de superficie CD4, CD8 y CD25, definiendo las siguientes poblaciones: células CD4 y CD8, CD4+ CD25+, CD8+ CD25+, CD4+ CD25- y CD8+ CD25-.

Además, se analizó el porcentaje de células que expresaron las citocinas IL-10 e IFN- γ , dando lugar a las poblaciones: CD4+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ +, CD8+ CD25+ IFN- γ +, CD4+ CD25- IFN- γ + y CD8+ CD25- IFN- γ +

Por último, también se determinó la expresión del factor de transcripción Foxp3, y se analizaron las poblaciones CD4+ CD25+ Foxp3+, CD8+ CD25+ Foxp3+, CD4+ CD25- Foxp3+ y CD8+ CD25- Foxp3+.

4.1. Estudio de la capacidad de las células dendríticas estimuladas con los productos larvarios de *Anisakis simplex* para generar linfocitos T reguladores en ratones BALB/c

4.1.1. Células CD4+

En primer lugar, se analizaron los cambios producidos en la población total de células CD4+. En la Tabla 86 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 86. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de linfocitos CD4+ obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | CD4+ (%) |
|---------|----------------|
| Control | 25,6 \pm 4,7 |
| ES | 21,5 \pm 2,4 |
| CE | 22,2 \pm 3 |

Se determinó el porcentaje de células CD4+ respecto al total de esplenocitos. La interacción con BMDDCs previamente estimuladas, tanto con ES como con CE, originó

un descenso en dicha población, que fue estadísticamente significativo respecto al control sin estimular en el caso de ES ($p=0,0273$) (Figura 143).

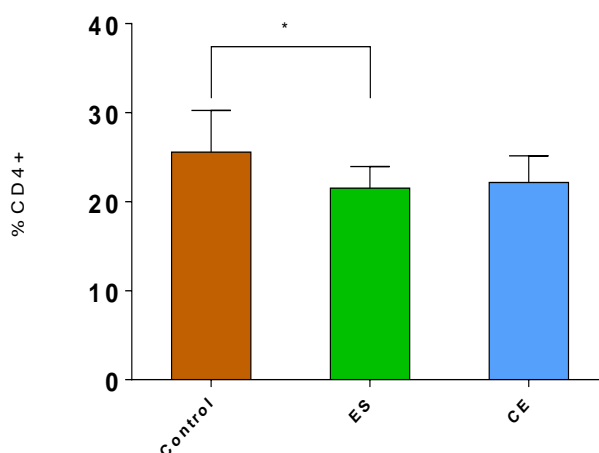


Figura 143. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD4 de ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. El descenso en la población CD4 fue estadísticamente significativo en presencia de BMDDCs, previamente estimuladas con ES solo respecto al control ($p=0,0273$).

Células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25-

En segundo lugar, se analizó el porcentaje de células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- presentes, referido al total de células CD4+. En la Tabla 87 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 87. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+CD25+ (%) | CD4+CD25- (%) |
|---------|------------------|------------------|
| Control | 15,4±9,5 | 81±9,4 |
| ES | 13,2±10,1 | 80,1±12,6 |
| CE | 17,7±5,6 | 78,3±3,5 |

Se observó un suave incremento de la población CD4+ CD25+ respecto al control sin estimular, en el caso de aquellos linfocitos incubados con BMDDCs que fueron previamente estimuladas con CE, mientras que aquellos incubados con BMDDCs previamente estimuladas con ES presentaron el efecto contrario. Por su parte, la población CD4+ CD25- no mostró apenas cambios respecto al control negativo (Figura 144).

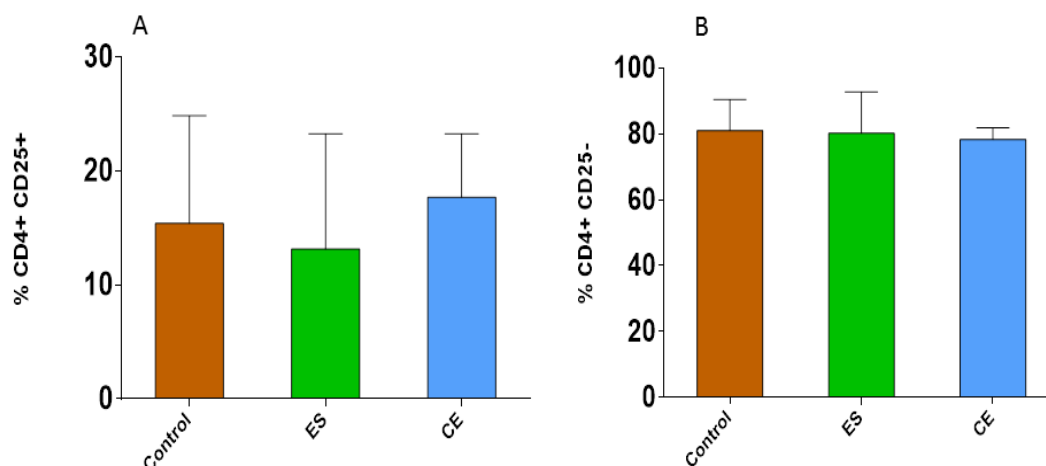


Figura 144. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de **A.** Células CD4+ CD25+. **B.** Células CD4+ CD25-. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25-: expresión de IL-10, IFN- γ y Foxp3

Una vez determinado el correspondiente porcentaje de células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- respecto al total de células CD4+, se procedió a analizar con mayor detalle dichas poblaciones. Las Tablas 88 y 89 muestran, por un lado, los porcentajes de las poblaciones CD4+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ + y CD4+ CD25+ Foxp3 + y, por otro, los porcentajes correspondientes a CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ + y CD4+ CD25- Foxp3+, también referidos al total de células CD4+.

Tabla 88. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de las poblaciones CD4+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ + y CD4+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+CD25+IL-10+ (%) | CD4+CD25+Foxp3+ (%) | CD4+CD25+IFN- γ + (%) |
|---------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Control | 3,6 \pm 1,5 | 7,4 \pm 2 | 5,7 \pm 2 |
| ES | 5 \pm 1,3 | 11,9 \pm 7,7 | 5,4 \pm 4,1 |
| CE | 7,3 \pm 3 | 15,7 \pm 3,4 | 10,2 \pm 4,5 |

En la mayoría de los casos, las tres poblaciones CD4+ CD25+ analizadas se vieron incrementadas respecto al control negativo en aquellos esplenocitos que se pusieron en contacto con BMDDCs previamente estimuladas tanto con ES como CE. Dicho incremento fue superior en el caso de CE en comparación con aquellas BMDDCs estimuladas con ES respecto al control sin estimular (Figura 145).

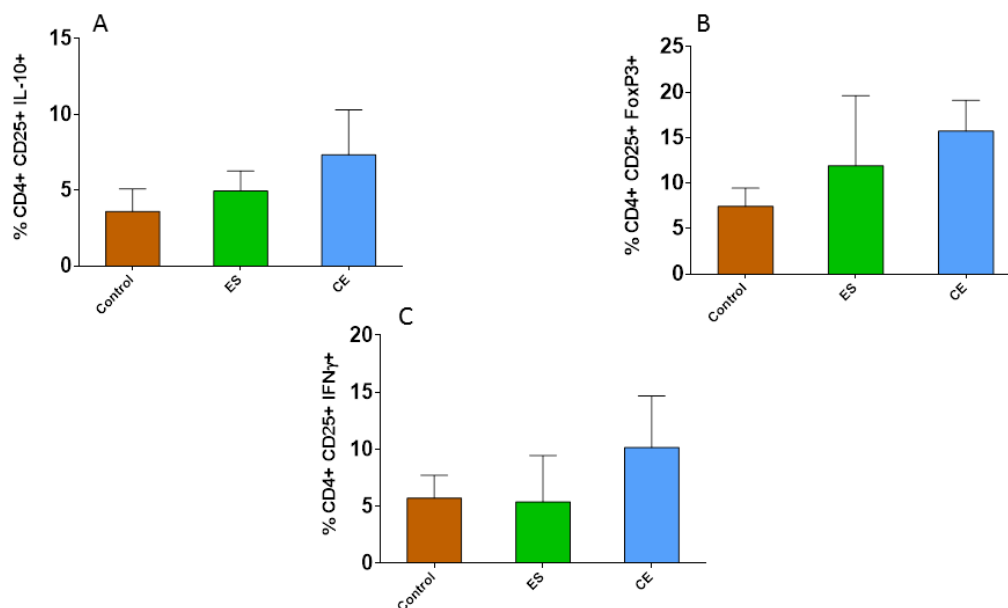


Figura 145. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

En cuanto a las poblaciones CD4+ CD25-, los resultados se muestran en la Tabla 89.

Tabla 89. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ y CD4+ CD25- Foxp3 +, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+CD25-IL-10+ (%) | CD4+CD25-Foxp3+ (%) | CD4+CD25-IFN- γ + (%) |
|---------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| Control | 2,2 \pm 1,51 | 5,9 \pm 4,78 | 4,6 \pm 4,2 |
| ES | 2,07 \pm 0,49 | 7 \pm 4,58 | 11,3 \pm 11,1 |
| CE | 1,76 \pm 1 | 5,9 \pm 6,38 | 2,1 \pm 1 |

En primer lugar, la población CD4+ CD25- IL-10+ no solo se vio disminuida respecto al control, tanto para ES como para CE, si no que en todos los casos su porcentaje fue inferior al de los linfocitos CD4+ CD25+ IL-10+ respecto al total de células CD4+. En cuanto a la población CD4+ CD25- Foxp3+, presentó un leve aumento en aquellos esplenocitos que se incubaron con BMDDCs previamente estimuladas con ES, mientras que CE no dio lugar a cambios respecto al control. Por su parte, la población CD4+ CD25- IFN- γ se vio incrementada en aquellos esplenocitos que interaccionaron con BMDDCs previamente estimuladas con ES, mientras que CE dio lugar al efecto contrario respecto al control (Figura 146).

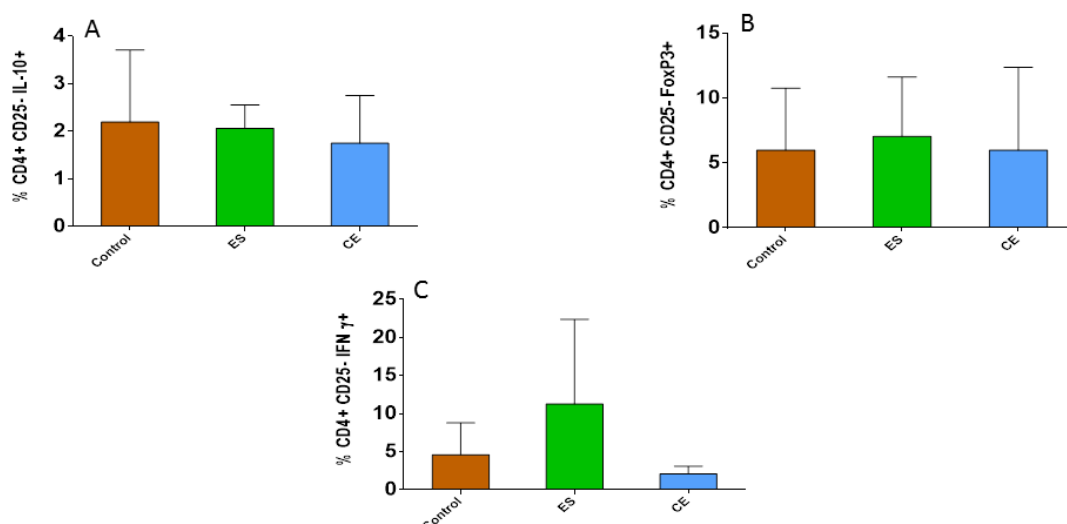


Figura 146. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

4.1.2. Células CD8+

En primer lugar, se analizaron los cambios producidos en la población total de linfocitos CD8+. En la Tabla 90 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 90. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de células CD8, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+ (%) |
|---------|---------------|
| Control | 9,6 \pm 3,6 |
| ES | 6,8 \pm 1,8 |
| CE | 7 \pm 2,9 |

Se analizó el porcentaje de células CD8 respecto al total de esplenocitos. La interacción con BMDDCs previamente estimuladas tanto con ES como CE originó un descenso en dicha población respecto al control sin estimular (Figura 147).

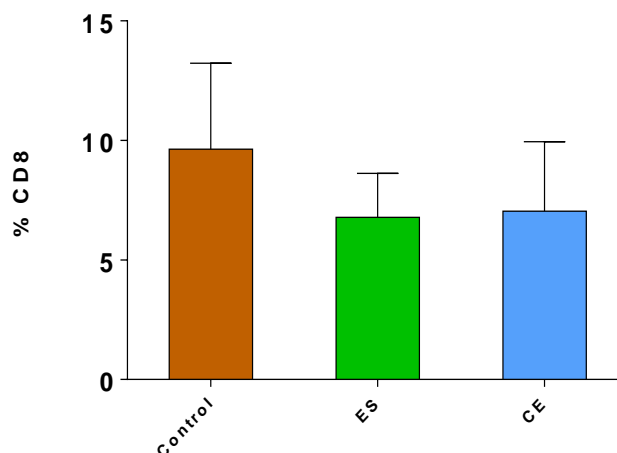


Figura 147. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8 de ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-

En segundo lugar, se analizó el porcentaje de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25- presentes, referido al total de linfocitos CD8+. En la Tabla 91 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 91. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+CD25+ (%) | CD8+CD25- (%) |
|---------|------------------|------------------|
| Control | 10,5±4,3 | 81±17,8 |
| ES | 8,5±6 | 86,1±14,6 |
| CE | 16,4±7,9 | 85,8±8,5 |

Se observó un suave incremento de la población CD8+ CD25+ en el caso de aquellos linfocitos incubados con BMDDCs previamente estimuladas con CE respecto al control negativo, mientras que aquellos incubados con BMDDCs previamente estimuladas con ES presentaron el efecto contrario. Por su parte, la población CD8+ CD25- apenas sufrió cambios respecto al control negativo, si bien se apreció un leve aumento tanto para ES como para CE que en ningún caso fue estadísticamente significativo (Figura 148).

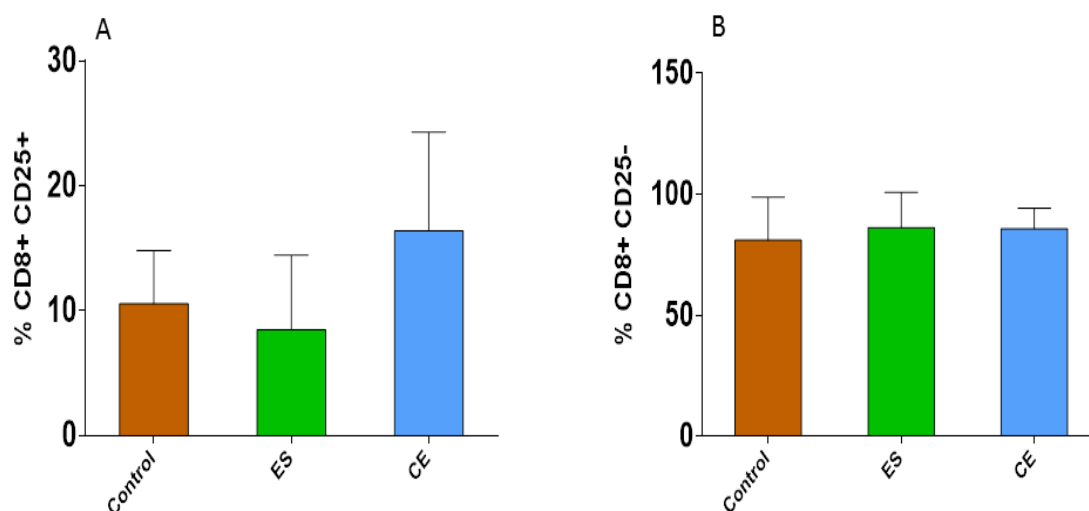


Figura 148. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8+ de ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. **A.** Células CD8+ CD25+. **B.** Células CD8+ CD25-. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-: expresión de IL-10, IFN- γ y Foxp3

Una vez determinado el correspondiente porcentaje de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25- respecto al total de células CD8+, se procedió a analizar con mayor detalle dichas poblaciones. Las Tablas 92 y 93 muestran, por un lado, los diferentes porcentajes de las poblaciones CD8+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IFN- γ + y CD8+ CD25+ Foxp3+ y, por el otro, los de las poblaciones CD8+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IFN- γ + y CD8+ CD25- Foxp3+, también referidos al total de células CD8+.

Tabla 92. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD8+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IFN- γ + y CD8+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+CD25+IL-10+ (%) | CD8+CD25+Foxp3+ (%) | CD8+CD25+IFN- γ + (%) |
|---------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| Control | 7,7 \pm 3,2 | 10,2 \pm 5,6 | 17,4 \pm 18,2 |
| ES | 2,5 \pm 1,5 | 10,1 \pm 7,7 | 16,8 \pm 16,8 |
| CE | 11 \pm 3,8 | 18,5 \pm 10,7 | 13,1 \pm 7,2 |

Las tres poblaciones CD8+ CD25+ analizadas se vieron incrementadas en aquellos esplenocitos que se pusieron en contacto con BMDDCs previamente estimuladas con CE, con la única excepción de CD8+ CD25+ IFN- γ + que disminuyó respecto al control sin estimular. Por su parte, las BMDDCs estimuladas con ES solo dieron lugar a cambios en la población CD8+ CD25+ IL-10+, la cual se vio disminuida respecto al control negativo (Figura 149).

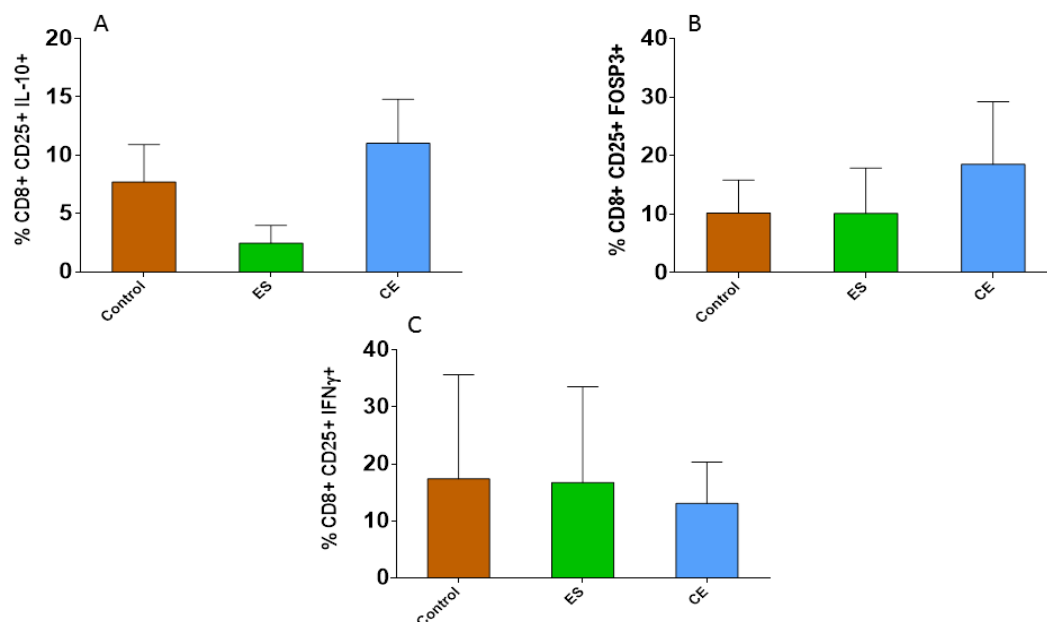


Figura 149. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

En cuanto a las poblaciones CD8+ CD25-, los resultados se muestran en la Tabla 93.

Tabla 93. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD8+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IFN- γ + y CD8+ CD25- Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+CD25-IL-10+ (%) | CD8+CD25-Foxp3+ (%) | CD8+CD25-IFN- γ + (%) |
|---------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| Control | 4,4 \pm 3,2 | 10,6 \pm 5,9 | 9,4 \pm 7,5 |
| ES | 5,8 \pm 5,4 | 17,6 \pm 9,2 | 12 \pm 5,6 |
| CE | 2,6 \pm 1,8 | 9,3 \pm 4,4 | 8,2 \pm 7,4 |

En todos los casos, las tres poblaciones CD8+ CD25- analizadas se vieron incrementadas en aquellos esplenocitos que se pusieron en contacto con BMDDCs previamente estimuladas con ES respecto al control sin estimular. Por su parte, la incubación de los esplenocitos con BMDDCs previamente estimuladas con CE originó un incremento de la población CD8+ CD25- Foxp3+, mientras que disminuyó a las otras dos, CD8+ CD25- IL-10+ y CD8+ CD25- IFN- γ +, respecto al control (Figura 150).

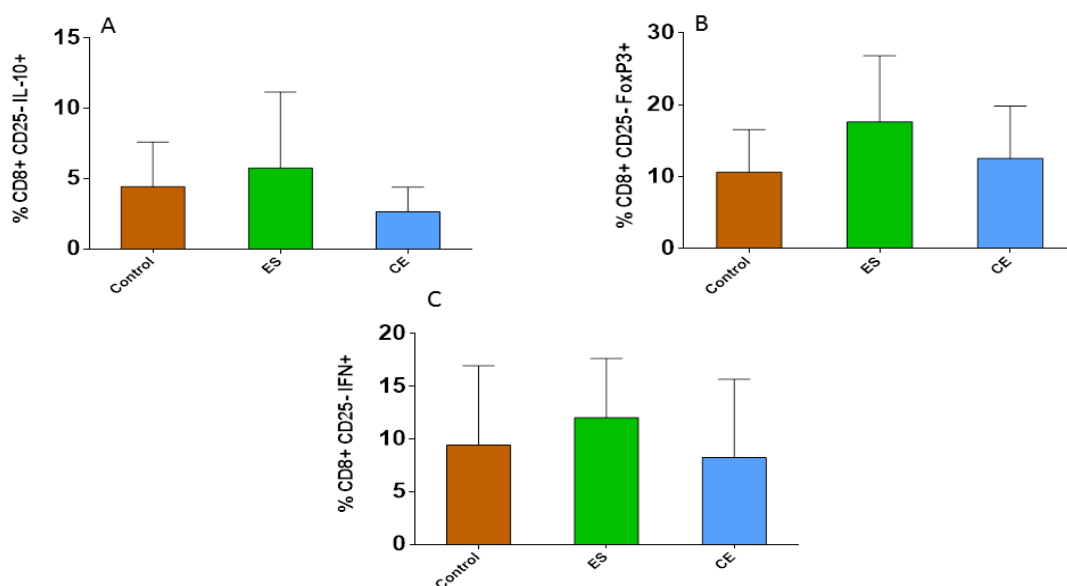


Figura 150. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

4.2. Estudio de la capacidad de las células dendríticas estimuladas con los productos larvarios de *Anisakis simplex* para generar linfocitos T reguladores en ratones C57BL/6

4.2.1. Células CD4+

En primer lugar, se analizaron los cambios producidos en la población total de linfocitos CD4+. En la Tabla 94 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 94. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de células CD4+ obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+ (%) |
|---------|----------------|
| Control | 13 \pm 1,6 |
| ES | 14,3 \pm 2 |
| CE | 14,6 \pm 2,4 |

Se analizó la evolución seguida por la población de células CD4+ al completo respecto al total de esplenocitos. La interacción con BMDDCs previamente estimuladas tanto

con ES como CE originó un incremento en dicha población respecto al control (Figura 151).

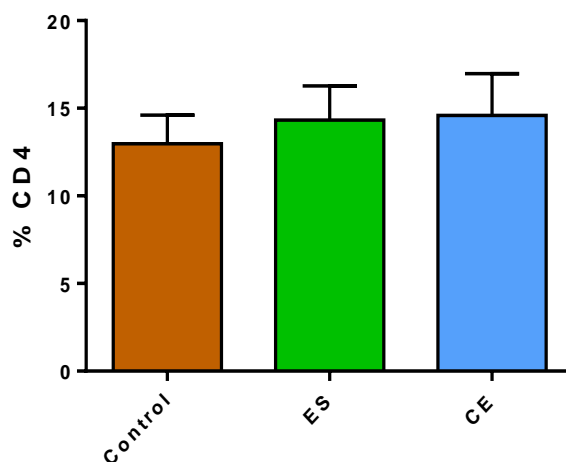


Figura 151. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD4+ de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25-

En segundo lugar, se analizó el porcentaje de células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- presentes, referido al total de células CD4+. En la Tabla 95 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 95. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de linfocitos CD4+ CD25+ y CD4+ CD25-, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+CD25+ (%) | CD4+CD25- (%) |
|---------|---------------|---------------|
| Control | 25,2±6,2 | 77±7,5 |
| ES | 21,5±7,6 | 78,5±7,6 |
| CE | 17,8±8 | 82,2±8 |

Se observó un descenso de la población CD4+ CD25+ en aquellas poblaciones incubadas con BMDDCs previamente estimuladas tanto con ES como con CE respecto al control sin estimular. Por su parte, la población CD4+ CD25- mostró cierta tendencia hacia el incremento tanto para ES como para CE respecto al control negativo (Figura 152).

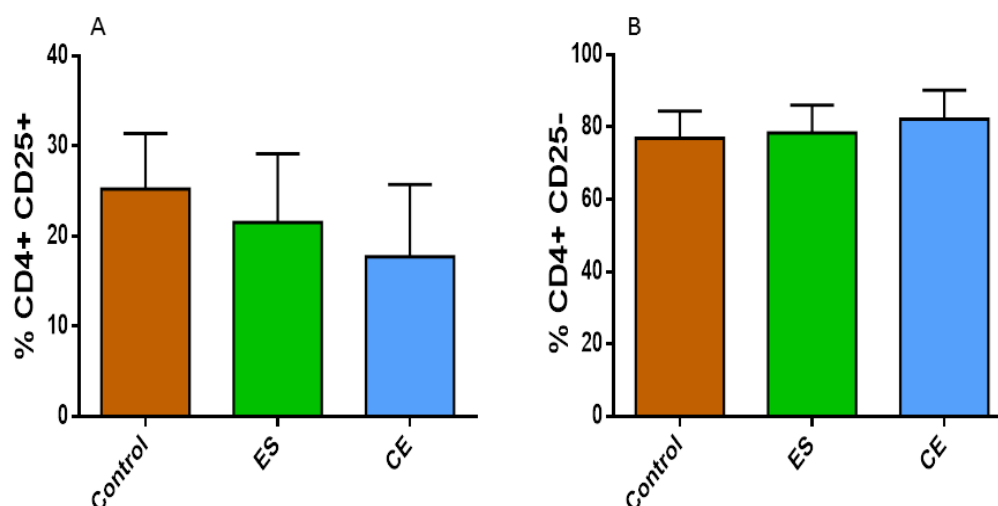


Figura 152. Resultados de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25+. **B.** Células CD4+ CD25-. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25-: expresión de IL-10, IFN- γ y Foxp3

Una vez determinado el correspondiente porcentaje de las poblaciones CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- respecto al total de células CD4+, se procedió a analizar con mayor detalle dichas poblaciones. Las Tablas 96 y 97 muestran, por un lado, los diferentes porcentajes de las poblaciones CD4+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ y CD4+ CD25+ Foxp3+ y por otro CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ y CD4+ CD25- Foxp3+, también referidos al total de células CD4+.

Tabla 96. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD4+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ y CD4+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+CD25+IL-10+ (%) | CD4+CD25+Foxp3+ (%) | CD4+CD25+IFN- γ + (%) |
|---------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Control | 17 \pm 1,3 | 22,7 \pm 7,3 | 20 \pm 5 |
| ES | 14,2 \pm 6,9 | 20,1 \pm 6,6 | 16,7 \pm 7,3 |
| CE | 11,4 \pm 7,2 | 16,7 \pm 8,8 | 14,7 \pm 7,7 |

Las tres poblaciones CD4+ CD25+ analizadas se vieron disminuidas respecto al control en todos los casos, tanto al entrar en contacto con BMDDCs previamente estimuladas con ES como con CE. Dicho descenso fue mayor en el caso de CE en comparación con aquellas BMDDCs estimuladas con ES respecto al control sin estimular (Figura 153).

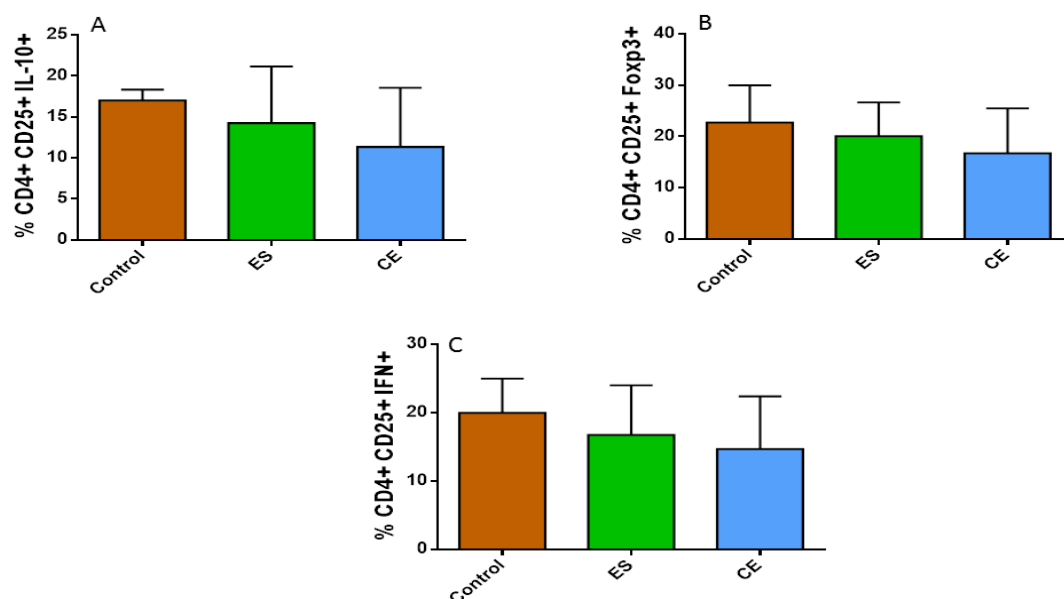


Figura 153. Resultados de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

En cuanto a las poblaciones CD4+ CD25-, los resultados se muestran en la Tabla 97.

Tabla 97. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ y CD4+ CD25- Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD4+CD25-IL-10+ (%) | CD4+CD25-Foxp3+ (%) | CD4+CD25-IFN- γ + (%) |
|---------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| Control | 11 \pm 7,7 | 20,8 \pm 1,4 | 21,6 \pm 12,8 |
| ES | 10,7 \pm 7,5 | 13,6 \pm 5,9 | 23,2 \pm 12,9 |
| CE | 10,9 \pm 2,3 | 37,4 \pm 15,9 | 32,6 \pm 12,6 |

En primer lugar, la población CD4+ CD25- IL-10+ no presentó apenas cambios respecto al control negativo en ningún caso. La población CD4+ CD25- Foxp3+, presentó un incremento en aquellos esplenocitos que se incubaron con BMDDCs previamente estimuladas con CE, mientras que ES originó el efecto contrario respecto al control negativo. Por su parte, la población CD4+ CD25- IFN- γ se vio incrementada respecto al control sin estimular en ambos casos, especialmente en aquellos esplenocitos que interaccionaron con BMDDCs previamente estimuladas con CE (Figura 154).

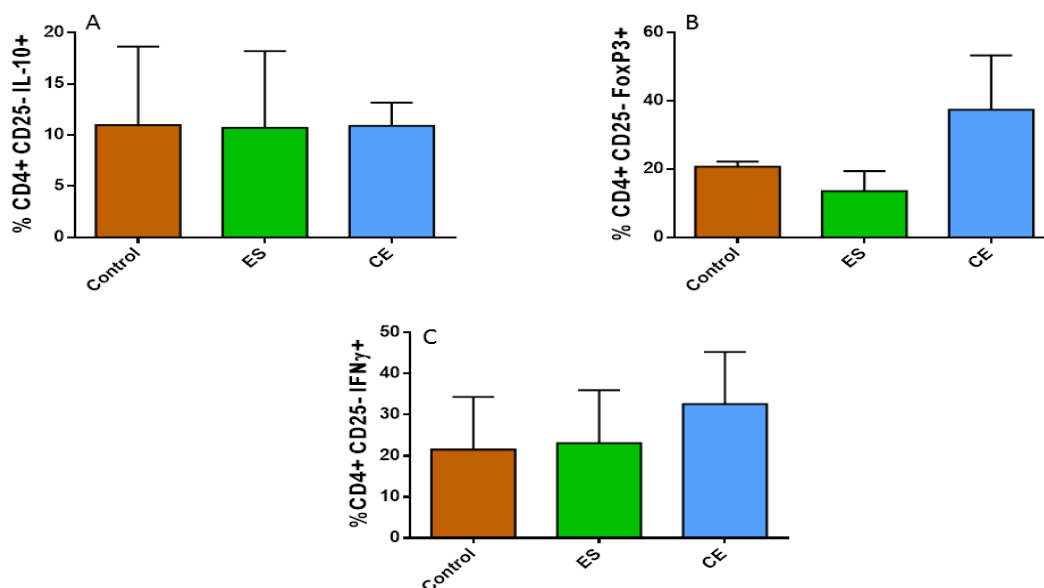


Figura 154. Resultados de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25- IFN-γ+. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

4.2.2. Células CD8+

En primer lugar, se analizaron los cambios producidos en la población total de linfocitos CD8+. En la Tabla 98 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 98. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de células CD8+ obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+ (%) |
|---------|----------|
| Control | 10,8±3 |
| ES | 12,6±3,2 |
| CE | 13,1±4 |

Se determinó el porcentaje de células CD8+ respecto al total de esplenocitos. La interacción con BMDDCs previamente estimuladas, tanto con ES como CE, originó un incremento en dicha población respecto al control negativo (Figura 155).

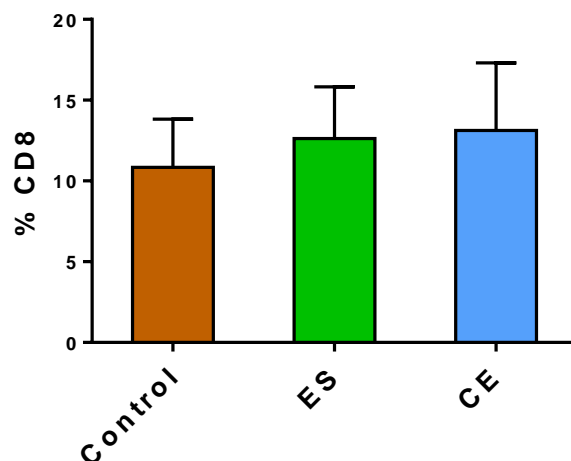


Figura 155. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8+ de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-

Se analizó el porcentaje de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25- presentes, referido al total de CD8+. En la Tabla 99 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 99. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. Los valores en rojo se corresponden con diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+CD25+ (%) | CD8+CD25- (%) |
|---------|---------------|---------------|
| Control | 21,9±4,6 | 78,1±4,6 |
| ES | 17,1±4 | 82,9±4 |
| CE | 14,4±5,7 | 85,6±5,7 |

Se observó un claro descenso respecto al control sin estimular de la población CD8+ CD25+ en aquellos linfocitos incubados con BMDDCs previamente estimuladas tanto con ES como con CE. Dicho descenso fue estadísticamente significativo para CE ($p=0,0112$). Por su parte, la población CD8+ CD25- experimentó el efecto contrario: un incremento en ambos casos respecto al control sin estimular. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para CE respecto al control sin estimular ($p=0,0112$) (Figura 156).

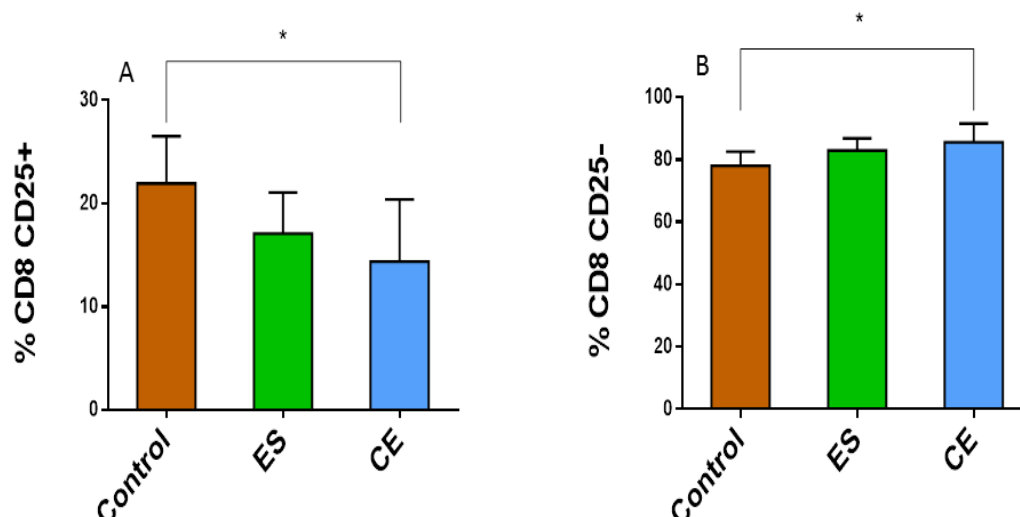


Figura 156. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8+ de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. **A.** Células CD8+ CD25+. El incremento en la población CD8+ CD25+ fue estadísticamente significativo en presencia de BMDDCs previamente estimuladas con CE solo respecto al control negativo ($p=0,0112$). **B.** Células CD8+ CD25-. El incremento en la población CD8+ CD25- fue estadísticamente significativo en presencia de BMDDCs previamente estimuladas con CE solo respecto al control negativo ($p=0,0112$).

Células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-: expresión de IL-10, IFN- γ y Foxp3

Una vez determinado el correspondiente porcentaje de las poblaciones CD8+ CD25+ y CD8+ CD25- respecto al total de linfocitos CD8+, se procedió a analizar con mayor detalle dichas poblaciones. Las Tablas 100 y 101 muestran, por un lado, los diferentes porcentajes de linfocitos CD8+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IFN- γ y CD8+ CD25+ Foxp3+ y, por otra parte, se muestran los de las poblaciones CD8+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IFN- γ y CD8+ CD25- Foxp3+, también referidas al total de células CD8+.

Tabla 100. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de las poblaciones CD8+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IFN- γ y CD8+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+CD25+IL-10+ (%) | CD8+CD25+Foxp3+ (%) | CD8+CD25+IFN- γ + (%) |
|---------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| Control | 15,6 \pm 2,2 | 17,2 \pm 6,4 | 21,4 \pm 2,8 |
| ES | 11,6 \pm 4 | 13,9 \pm 2,3 | 16,1 \pm 4,7 |
| CE | 11,1 \pm 6,6 | 12,1 \pm 2,1 | 14,1 \pm 4,9 |

Para las tres poblaciones CD8+ CD25+ analizadas se observó respecto al control negativo una disminución en aquellos esplenocitos que se pusieron en contacto con BMDDCs previamente estimuladas, tanto con ES como con CE (Figura 157).

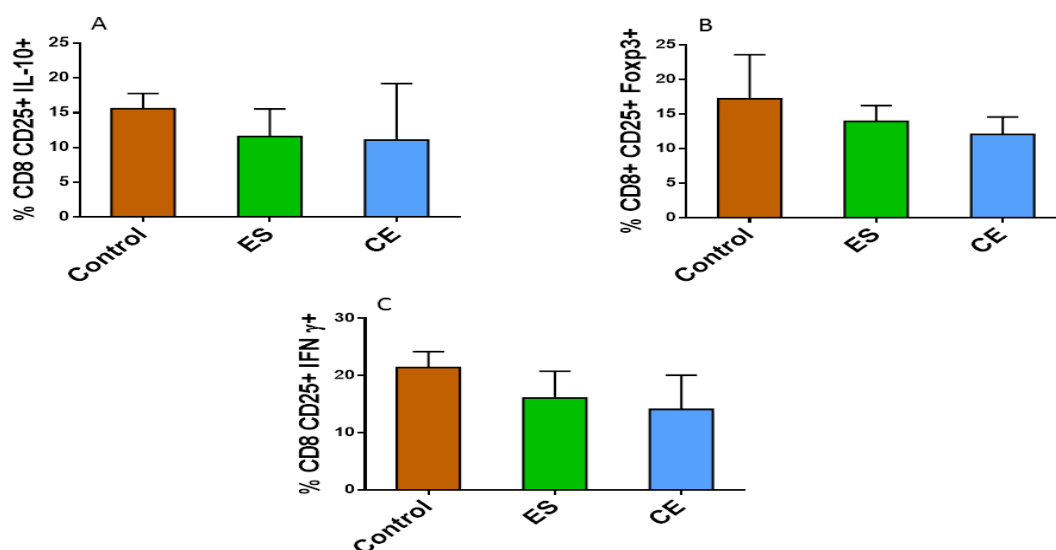


Figura 157. Resultados ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

En cuanto a las poblaciones CD8+ CD25-, los resultados se muestran en la Tabla 101.

Tabla 101. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de las poblaciones CD8+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IFN- γ + y CD8+ CD25- Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

| | CD8+CD25-IL-10+ (%) | CD8+CD25-Foxp3+ (%) | CD8+CD25-IFN- γ + (%) |
|---------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| Control | 6,9 \pm 3,4 | 28,3 \pm 9,1 | 23,3 \pm 17,1 |
| ES | 5,7 \pm 2,1 | 20,3 \pm 6 | 20,4 \pm 8,9 |
| CE | 8,8 \pm 2,5 | 41,8 \pm 11,3 | 30,5 \pm 9,9 |

En todos los casos, las tres poblaciones CD8+ CD25- analizadas se vieron incrementadas en aquellos esplenocitos que se pusieron en contacto con BMDDCs previamente estimuladas con CE, mientras que ES originó el efecto contrario respecto al control negativo (Figura 158).

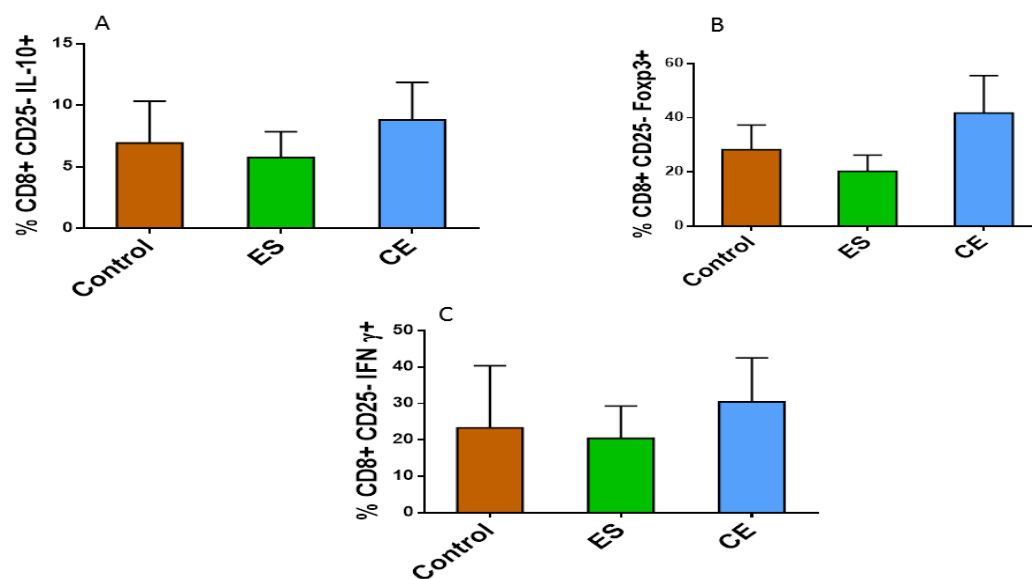


Figura 158. Resultados ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

5. ESTUDIO DEL EFECTO *in vitro* DE LOS ANTÍGENOS LARVARIOS *Anisakis simplex* SOBRE LA CAPACIDAD LINFOPROLIFERATIVA DE ESLENOCITOS VÍRGENES EXTRAÍDOS DE BAZO DE RATONES BALB/c Y C57BL/6

5.1. Estandarización del método fluorimétrico empleando resazurina para determinar *in vitro* el efecto de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la capacidad linfoproliferativa de esplenocitos vírgenes extraídos de bazo de ratón

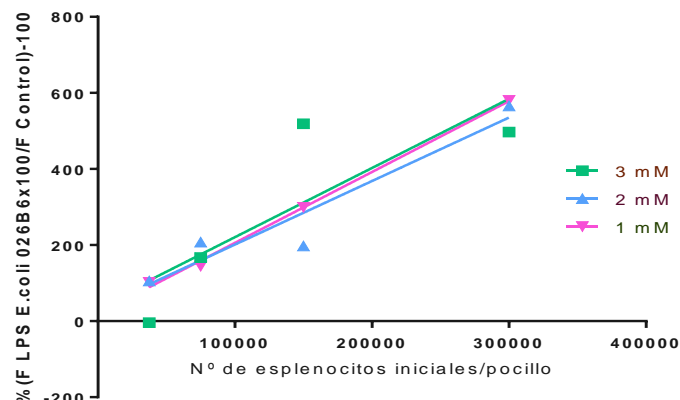
El protocolo llevado a cabo para realizar este ensayo fue previamente estandarizado basándonos en la bibliografía existente (Abu-Amro y Bosley, 2005; O'Brien *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 1994; Ibáñez Escribano, 2012; Rampersad, 2012; Riss *et al.*, 2013-2016; Zeni *et al.*, 2015).

Para la estandarización del método de linfoproliferación *in vitro* se ajustaron las siguientes condiciones: número de esplenocitos iniciales, concentración de trabajo de resazurina y tiempo de incubación con el colorante redox.

En primer lugar, se determinó la concentración de trabajo de resazurina óptima. Para ello se llevaron a cabo varias curvas de crecimiento incubando con tres concentraciones de trabajo del colorante redox (3, 2 y 1 mM) con concentraciones crecientes de esplenocitos (37.500 esplenocitos/pocillo, 75.000 esplenocitos/pocillo, 150.000 esplenocitos/pocillo, 300.000 esplenocitos/pocillo), revelando la placa a distintos tiempos. Además, se estimuló con LPS *E. coli* 026B6 como control positivo (1 µg/ml).

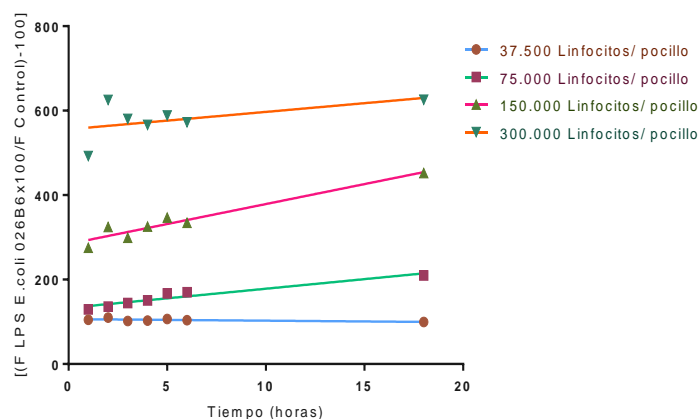
El objetivo fue seleccionar la concentración de trabajo de resazurina que permitiera la determinación de una relación proporcional entre la intensidad de fluorescencia y el crecimiento de los esplenocitos. La concentración de resazurina de 1 mM ($R^2 = 0,9973$) mostró el mayor coeficiente de correlación de entre las ensayadas en las curvas de crecimiento. Los resultados gráficos y numéricos de las lecturas fluorimétricas tras 3 h de incubación con el colorante redox (51 h desde el inicio del ensayo con la adición de LPS *E. coli* 026B6), se reflejan en la Figura 159.

Así mismo, realizando nuevas curvas de crecimiento con inóculos crecientes en función del tiempo (tras 48 h del inicio de la estimulación con LPS *E. coli* 026B6, se adicionó la resazurina y se midió a las 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h y 18 h) se definió el número de esplenocitos iniciales por pocillo óptimo. La Figura 160 muestra los resultados en las distintas condiciones. La mayor linealidad en las curvas de estandarización se obtiene para el inóculo de 150.000 esplenocitos/pocillo al inicio de la incubación con un coeficiente de correlación lineal de $R^2 = 0,9172$. La concentración de trabajo de la resazurina fue de 1 mM en dicha estandarización.



| Nº | 3 mM | 2 mM | 1 mM |
|---------|------------|------------|------------|
| 37.500 | -4,181185 | 105,842300 | 101,891300 |
| 75.000 | 167,428600 | 207,818900 | 144,484300 |
| 150.000 | 518,732800 | 197,451500 | 299,142200 |
| 300.000 | 496,901300 | 565,925600 | 580,487800 |
| R² | 0,6797 | 0,9112 | 0,9973 |

Figura 159. Resultados de las curvas de crecimiento de los esplenocitos en presencia de tres concentraciones distintas del colorante redox y estimulados con LPS *E. coli* 026B6. Se representa gráficamente el incremento, en tanto por cien, de la intensidad de fluorescencia de los esplenocitos estimulados con LPS *E. coli* 026B6 respecto al control $[(F \text{ LPS } E. coli \text{ 026B6} \times 100 / F \text{ Control}) - 100]$, registrado para las distintas concentraciones de resazurina ensayadas, tras 51 h de incubación desde el inicio de la estimulación y tras 3 h de la adición de la resazurina a 37 °C. En la Tabla se incluyen los datos numéricos obtenidos, así como la constante de regresión R. Los resultados se han obtenido a partir de dos experimentos independientes.



| Esplenocitos/pocillo | Pendiente (b) | Ordenada en | R² |
|----------------------|---------------|-------------|--------|
| 37.500 | -0,3668 | 106,3 | 0,3915 |
| 75.000 | 4,548 | 132,8 | 0,9184 |
| 150.000 | 9,452 | 284,3 | 0,9328 |
| 300.000 | 4,127 | 555,7 | 0,2782 |

Figura 160. Resultados obtenidos tras la incubación con resazurina (1 mM) de concentraciones crecientes de esplenocitos a distintos tiempos (de 1 h a 18 h). La Gráfica representa el incremento en tanto por cien de la fluorescencia registrada de los esplenocitos estimulados con LPS *E. coli* 026B6 respecto al control, a los distintos tiempos. En la Tabla se resumen los parámetros obtenidos para cada curva de crecimiento. Los resultados se han obtenido a partir de dos experimentos independientes.

De este modo, los principales parámetros en la metodología a seguir, la concentración de trabajo de la resazurina (1 mM) y el número de esplenocitos iniciales por pocillo (150.000 esplenocitos/pocillo), quedaron establecidos. Se procedió a realizar el ensayo de linfoproliferación bajo dichas condiciones.

5.2. Estudio de la capacidad linfoproliferativa de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex*: ensayo de linfoproliferación empleando resazurina

Tal y como se describió en el apartado de Materiales y Métodos correspondiente de esta Tesis Doctoral, los esplenocitos extraídos de bazo de ratón se llevaron a tres placas de 96 pocillos y se estimularon de forma idéntica.

La placa 1 se incubó 24 h; la placa 2, 48 h y la placa 3, 72 h. Así mismo, en la placa 1 la resazurina se adicionó pasada 1 h del comienzo de la estimulación con los antígenos correspondientes; en la placa 2, la resazurina se cargó en los pocillos pasadas 24 h del inicio de la estimulación, y en el caso de la placa 3, la resazurina se añadió tras 48 h del comienzo de la estimulación. Se hicieron las medidas de Intensidad de Fluorescencia a los tiempos indicados desde la adición de la resazurina.

De este modo, se pudo establecer, por un lado, la cinética de la linfoproliferación provocada por cada uno de los antígenos y combinaciones, además de comparar el aumento en la intensidad de fluorescencia de cada uno de los tratamientos en función del tiempo.

Los resultados obtenidos se dividieron en Día 1 (Placa 1), Día 2 (Placa 2) y Día 3 (Placa 3). Se describen, para ambas cepas de ratón, a continuación.

5.2.1. Efectos de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la capacidad proliferativas de esplenocitos extraídos de bazo de ratones BALB/c

Los esplenocitos se estimularon con los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, solos o acompañados por LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826), así como por estos dos en solitario. En paralelo se dejaron pocillos control con esplenocitos sin estimular.

A) Día 1

El día uno comprendió las primeras 24 h tras la adición de los antígenos correspondientes. A tiempo cero, se añadió la resazurina (1 mM). Se realizaron las lecturas de Intensidad de Fluorescencia a lo largo del tiempo y se obtuvieron los siguientes resultados.

En primer lugar, la estimulación con ES y CE dio lugar a una Intensidad de Fluorescencia media superior a la del control sin estimular en la mayoría de los casos, siendo estadísticamente significativo en los tiempos indicados en la Tabla 102.

Tabla 102. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 1 en ratones BALB/c.. Los datos cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | Control | ES | CE |
|------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| 2 | 8409 \pm 671,5 | 8147,3 \pm 241,9 | 7982,8 \pm 135,8 |
| 3 | 10606,5 \pm 662,3 | 10957 \pm 310 | 10691,5 \pm 199,8 |
| 4 | 13161,5 \pm 811,3 | 13260,5 \pm 102,3 | 12976,3 \pm 134,5 |
| 5 | 15280,5 \pm 768,1 | 15481 \pm 159,5 | 15467,3 \pm 223,6 |
| 6 | 17163 \pm 651,3 | 17784,8 \pm 117,2 | 18212 \pm 890,9 |
| 7 | 18913,8 \pm 728,6 | 18883,8 \pm 127 | 19098,3 \pm 178,4 |
| 8 | 20857,3 \pm 693,3 | 22111,3 \pm 220,5 | 22235,3 \pm 364,2 |
| 9 | 21343,3 \pm 572,4 | 22815,3 \pm 103,8 | 22906,5 \pm 793,4 |
| 17 | 31669 \pm 691,7 | 32701 \pm 309,6 | 32804,8 \pm 359,7 |
| 18 | 32225 \pm 916,9 | 34156,3 \pm 412,3 | 34371 \pm 137,6 |
| 19 | 32175 \pm 827,6 | 34099,5 \pm 369,5 | 34456,8 \pm 160,1 |
| 20 | 32066,5 \pm 1084,5 | 34489,5 \pm 468,7 | 34705,3 \pm 125,7 |
| 21 | 32309,3 \pm 929,3 | 34999 \pm 444,8 | 35319 \pm 111,6* |
| 22 | 32107,3 \pm 979,5 | 34809 \pm 436,2 | 35158,3 \pm 141,8* |
| 23 | 32208 \pm 1055,8 | 35299,3 \pm 348* | 35505,3 \pm 263,8** |
| 24 | 32889,3 \pm 175,1 | 37354,5 \pm 606,3*** | 37924 \pm 217,4*** |

En segundo lugar, se determinó el efecto de ES o CE sobre el estímulo ejercido por LPS *E. coli* 026B6 en solitario. Como se puede observar, la Intensidad Media de Fluorescencia fue más o menos similar para los tres tratamientos, si bien en los primeros tiempos se puede apreciar, en el caso de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES, Intensidades Medias de Fluorescencia inferiores a las de LPS *E. coli* 026B6 en solitario, siendo estadísticamente significativo a los tiempos 5 h y 9 h desde la adición de la resazurina (Tabla 103).

Tabla 103. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 1 en ratones BALB/c.. Los datos cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | LPS <i>E. coli</i> 026B6 | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + ES | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + CE |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 7438,8 \pm 480,7 | 7714,5 \pm 589,6 | 7407,8 \pm 260,8 |
| 3 | 10271,3 \pm 407,8 | 10352 \pm 636,5 | 10086 \pm 579,1 |
| 4 | 12494 \pm 546,7 | 12436,5 \pm 786,9 | 12537,5 \pm 604,5 |
| 5 | 14749,8 \pm 521,1 | 14770,5 \pm 774,9 | 11803 \pm 3704* |
| 6 | 16961 \pm 449,7 | 16924,8 \pm 762,2 | 17385 \pm 547,5 |
| 7 | 18686,8 \pm 441,2 | 18586,5 \pm 709,4 | 18378,5 \pm 992,8 |
| 8 | 21628,3 \pm 633,8 | 21492,5 \pm 826,2 | 20123,8 \pm 2010,3 |
| 9 | 22222,8 \pm 510 | 21786,3 \pm 828,1 | 18406,3 \pm 4896,8*** |
| 17 | 34941,3 \pm 797 | 34202 \pm 399,9 | 33802,3 \pm 411,9 |
| 18 | 35954,5 \pm 706,3 | 35072,8 \pm 894 | 36274,8 \pm 273,9 |
| 19 | 36074 \pm 747,7 | 35240,8 \pm 863,8 | 36418,5 \pm 193,8 |
| 20 | 36284,8 \pm 650 | 35468,3 \pm 801,7 | 36637,5 \pm 177,7 |
| 21 | 36742,8 \pm 729,9 | 36210,3 \pm 721,8 | 37625,3 \pm 164 |
| 22 | 36918,8 \pm 893,1 | 36323,8 \pm 733,3 | 37792 \pm 100,4 |
| 23 | 37433,5 \pm 749,6 | 37051 \pm 672,7 | 38330,8 \pm 120,5 |
| 24 | 39696,3 \pm 728 | 39470,3 \pm 598,2 | 40501,3 \pm 138,7 |

En tercer lugar, se analizó el efecto de ES o CE al combinarlo con CpG (ODN1826) sobre los esplenocitos respecto a CpG (ODN1826) en solitario. Si bien en un principio las Intensidades Medias de Fluorescencias fueron superiores para CpG (ODN1826) solo, con el paso de tiempo la asociación tanto de ES como de CE con CpG (ODN1826) aumentó la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a CpG (ODN1826) solo (Tabla 104).

Tabla 104. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 1 en ratones BALB/c. Los valores de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los datos en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | CpG (ODN1826) | CpG (ODN1826) + ES | CpG (ODN1826) + CE |
|------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 2 | 8461,3 \pm 547,9 | 8388,3 \pm 270,3 | 7595,8 \pm 434 |
| 3 | 11560,5 \pm 339,8 | 11401,3 \pm 155,2 | 9688,8 \pm 1102,7 |
| 4 | 14313,5 \pm 301,1 | 14055 \pm 267,2 | 11847,8 \pm 1465,5 |
| 5 | 14934,3 \pm 3574,2 | 14451,3 \pm 3876,6 | 13189 \pm 2971,6 |
| 6 | 19311,5 \pm 329 | 19269 \pm 376,1 | 17794,3 \pm 972,4 |
| 7 | 20985,3 \pm 181,4 | 21111 \pm 523,8 | 19460,3 \pm 1153,2 |
| 8 | 23782,8 \pm 609,3 | 23937,3 \pm 367 | 21345,8 \pm 1912,1 |
| 9 | 24487 \pm 371,6 | 24506,3 \pm 163,8 | 21463,8 \pm 2911,2* |
| 17 | 36282,8 \pm 1202,2 | 36255 \pm 370,2 | 37065,8 \pm 438,5 |
| 18 | 37589 \pm 932,4 | 38171,3 \pm 541,7 | 38917 \pm 1303,8 |
| 19 | 37685,8 \pm 682,5 | 38671 \pm 566,1 | 39053,8 \pm 1328,5 |
| 20 | 37836 \pm 753,4 | 38755,8 \pm 610 | 39390,8 \pm 1335,2 |
| 21 | 38799,8 \pm 679,6 | 39523 \pm 376,5 | 40375,5 \pm 1315,6 |
| 22 | 38246,3 \pm 1198,2 | 39566,5 \pm 442,9 | 40519 \pm 1247,5 |
| 23 | 38724,3 \pm 8788,6 | 40063,3 \pm 302,8 | 41332 \pm 1339,8 |
| 24 | 41754,5 \pm 815,9 | 42302,3 \pm 210,9 | 43193,5 \pm 1372,3 |

B) Día 2

El Día 2 incluyó todas aquellas lecturas realizadas en el periodo de tiempo comprendido entre las 24 y las 48 h tras la adición de los estímulos correspondientes. La resazurina se añadió tras 24 h de incubación de los esplenocitos en presencia de los antígenos a ensayar. Se realizaron las lecturas de Intensidad de Fluorescencia a lo largo del tiempo y se obtuvieron los siguientes resultados.

En primer lugar, como se realizó a Día 1, se analizó la Intensidad Media de Fluorescencia ocasionada por ES o CE respecto al control. Si bien al comienzo la Intensidad Media de Fluorescencia fue inferior para ES y CE respecto al control negativo, con el paso del tiempo esta relación se invierte. Como se puede apreciar en la Tabla 105, la Intensidad Media de Fluorescencia fue superior tanto para ES como para CE respecto al control sin estimular. Dicho incremento fue estadísticamente significativo a distintos tiempos indicados.

Tabla 105. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 2 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | Control | ES | CE |
|------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 1430,8 \pm 103,4 | 943 \pm 97,2 | 950,5 \pm 135,8 |
| 2 | 4367,8 \pm 419 | 3092 \pm 331,9 | 3118,5 \pm 393,2 |
| 3 | 6538,8 \pm 239,5 | 6745,3 \pm 300,8 | 6361,5 \pm 425,8 |
| 4 | 8188,3 \pm 478,3 | 8583,8 \pm 67,2 | 8467,8 \pm 135,8 |
| 5 | 9736,3 \pm 444,7 | 10339,8 \pm 185,3 | 10133 \pm 100,7 |
| 6 | 10602,8 \pm 555,8 | 11319,3 \pm 131,8 | 11189,5 \pm 248,7 |
| 7 | 12456,5 \pm 604,1 | 13501,5 \pm 232,6 | 13280,8 \pm 205,4 |
| 8 | 13568,5 \pm 645,2 | 14846,5 \pm 58 | 14497,5 \pm 157,6 |
| 9 | 14679,8 \pm 686,3 | 16160 \pm 111,9 | 15969,5 \pm 293,3 |
| 10 | 15640,5 \pm 776,6 | 17307,8 \pm 67,8* | 17037,3 \pm 142 |
| 11 | 16699,3 \pm 724,6 | 18175,5 \pm 222,6 | 18071,3 \pm 289,8 |
| 12 | 17180,3 \pm 766,8 | 19174 \pm 284,5** | 18887,5 \pm 414,3* |
| 13 | 18263,3 \pm 867,8 | 20685 \pm 107,5*** | 20481,3 \pm 209,8*** |
| 14 | 18519,8 \pm 187,9 | 21630,5 \pm 59,1*** | 21490 \pm 151,7*** |
| 24 | 26659 \pm 1529,9 | 30771,3 \pm 203,4*** | 30354,3 \pm 356,6*** |

En segundo lugar, se determinó el efecto de ES o CE al asociarlos con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario. Si bien al comienzo del experimento la Intensidad Media de Fluorescencia fue inferior para ES y CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario, con el paso del tiempo estas tiende a igualarse. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 106).

Tabla 106. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 2 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| Tiempo (h) | LPS <i>E. coli</i> 026B6 | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + ES | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + CE |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1103 \pm 234,5 | 870,3 \pm 10 | 1061 \pm 219,6 |
| 2 | 3340 \pm 459,8 | 3288 \pm 190,4 | 3471 \pm 762,2 |
| 3 | 7654,3 \pm 717,7 | 7432,8 \pm 293,9 | 7768,5 \pm 366,7 |
| 4 | 9996,8 \pm 608,9 | 9335,8 \pm 368,8 | 9773,5 \pm 272,6 |
| 5 | 12403 \pm 300,4 | 11972 \pm 310,3 | 12401,3 \pm 307 |
| 6 | 13726,8 \pm 462,5 | 13473,5 \pm 387 | 13618 \pm 566,9 |
| 7 | 16261,3 \pm 286,9 | 15971 \pm 308,7 | 15685,3 \pm 1744,9 |
| 8 | 17926,3 \pm 227,6 | 17673,8 \pm 172,9 | 17867,3 \pm 544,7 |
| 9 | 19685,3 \pm 250,6 | 19368 \pm 296,2 | 18952,8 \pm 2039,3 |
| 10 | 21028,8 \pm 185,1 | 20751,8 \pm 402,5 | 20313 \pm 2281,2 |
| 11 | 22097 \pm 276,2 | 21798 \pm 338,9 | 21860 \pm 560,1 |
| 12 | 23463,3 \pm 492,3 | 23241 \pm 684,6 | 22489,3 \pm 2489,1 |
| 13 | 25223,3 \pm 125,2 | 25044,8 \pm 342 | 24311,5 \pm 2624,4 |
| 14 | 26630,8 \pm 170,6 | 26466 \pm 298,3 | 27068,3 \pm 287 |
| 24 | 37844,5 \pm 292,8 | 37668,8 \pm 519,9 | 37202,3 \pm 1672,9 |

En cuanto a cómo afectó la combinación de ES o CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario a la proliferación celular de los esplenocitos de ratón empleado, la Tabla 107 muestra los resultados obtenidos: tanto ES como CE incrementaron la Intensidad Media de Fluorescencia al asociarse con CpG (ODN1826) respecto a este último en solitario. Dicho incremento fue estadísticamente significativo a los tiempos indicados.

Tabla 107. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 2 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | CpG (ODN1826) | CpG (ODN1826) + ES | CpG (ODN1826) + CE |
|------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 1156,8 \pm 105,8 | 1416,5 \pm 377 | 1182,5 \pm 155,5 |
| 2 | 4467 \pm 256,1 | 5148,5 \pm 835,8 | 5073,3 \pm 245,9 |
| 3 | 9779,3 \pm 566,8 | 10890,8 \pm 442,5 | 11513,8 \pm 409,7* |
| 4 | 12313,5 \pm 637,1 | 13672,3 \pm 598 | 14859,3 \pm 512,8*** |
| 5 | 15621,5 \pm 590,8 | 16753,5 \pm 672,8 | 17415,8 \pm 264,7** |
| 6 | 17335,8 \pm 529,1 | 18638 \pm 584,8 | 19298,3 \pm 299,4** |
| 7 | 20344 \pm 835,6 | 21936 \pm 347,2* | 22612,8 \pm 362,3*** |
| 8 | 22264,3 \pm 999,6 | 23862 \pm 559,1* | 24592 \pm 261,7*** |
| 9 | 24009 \pm 1097,7 | 25902,5 \pm 527,6** | 26570,5 \pm 310,3*** |
| 10 | 25518,8 \pm 1150,5 | 27340,5 \pm 719,7** | 28117,8 \pm 193,1*** |
| 11 | 26510,5 \pm 970,9 | 28865,5 \pm 983,8*** | 29501,3 \pm 218,1*** |
| 12 | 27675 \pm 1205,5 | 30276,3 \pm 710,2*** | 30940,8 \pm 244,3*** |
| 13 | 29803,8 \pm 1280,7 | 32325,5 \pm 894,4*** | 33201 \pm 77,7*** |
| 14 | 31126 \pm 1477,5 | 33898,8 \pm 853,1*** | 34990,3 \pm 118,2*** |
| 24 | 40026,5 \pm 1563,5 | 43129 \pm 852,5*** | 43966,5 \pm 244,3*** |

C) Día 3

El día tres incluyó todas aquellas lecturas realizadas en el periodo de tiempo comprendido entre las 48 y las 72 h tras la adición de los antígenos correspondientes. La resazurina se añadió tras 48 h de incubación de los esplenocitos en presencia de los antígenos a ensayar. Se realizaron las lecturas de Intensidad de Fluorescencia a lo largo del tiempo y se obtuvieron los resultados siguientes.

En primer lugar se determinó el efecto de ES o CE sobre la proliferación celular de los esplenocitos de ratón respecto al control sin estimular. Como se puede observar en la Tabla 108, a Día 3, la Intensidad Media de Fluorescencia fue claramente superior para ES y CE respecto al control sin estimular, siendo dicho incremento estadísticamente significativo en los casos indicados.

Tabla 108. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 3 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | Control | ES | CE |
|------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| 1 | 743,8 \pm 59,8 | 945,3 \pm 356,6 | 979,8 \pm 250,5 |
| 2 | 2855,3 \pm 120,9 | 3102,3 \pm 480,7 | 3626 \pm 289,1 |
| 4 | 5832,3 \pm 199,6 | 6783,3 \pm 276 | 8616 \pm 2528,6 |
| 5 | 6911 \pm 238,9 | 8283,3 \pm 226,3 | 10257,8 \pm 2990,3 |
| 6 | 8235 \pm 292,6 | 9958,3 \pm 289,1 | 12493,5 \pm 3684,6 |
| 7 | 9071 \pm 340,5 | 10943,8 \pm 172,8 | 13554 \pm 4072,5 |
| 8 | 10034,3 \pm 349,1 | 12229 \pm 262,9 | 15246,5 \pm 4406,7 |
| 9 | 10846,8 \pm 353,5 | 13399,8 \pm 248,1 | 16714,5 \pm 5026,3 |
| 10 | 11649,3 \pm 404,1 | 14557,8 \pm 365,6 | 17977 \pm 5400,1 |
| 11 | 12679 \pm 502 | 15719,3 \pm 472,7 | 19408,3 \pm 5723,9 |
| 24 | 21899 \pm 900,6 | 27620 \pm 842,1 | 32954,3 \pm 7530,9** |

En segundo lugar, la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 dio lugar, en ambos casos, a un incremento en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario a lo largo del tiempo (Tabla 109).

Tabla 109. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 3 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| Tiempo (h) | LPS <i>E. coli</i> 026B6 | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + ES | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + CE |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1198 \pm 509,5 | 1292,5 \pm 349 | 1344 \pm 200,9 |
| 2 | 5650 \pm 413,1 | 4986 \pm 693,1 | 5989,8 \pm 630,5 |
| 4 | 10800 \pm 3325,6 | 12076 \pm 318,3 | 12760 \pm 360,1 |
| 5 | 12864,5 \pm 4209,4 | 14635,8 \pm 506,1 | 15246 \pm 612,5 |
| 6 | 15815,8 \pm 5005,1 | 18071,3 \pm 300 | 18971,3 \pm 325 |
| 7 | 16990 \pm 5384,4 | 19403,3 \pm 410,9 | 20293,3 \pm 326 |
| 8 | 19168,8 \pm 5996,2 | 21761,5 \pm 310,2 | 22882 \pm 331,4 |
| 9 | 20927,8 \pm 6476,4 | 23832,3 \pm 374,7 | 2501 \pm 328,1 |
| 10 | 22648 \pm 7067,5 | 25782,3 \pm 321 | 26741,8 \pm 220,4 |
| 11 | 24072,8 \pm 7239,4 | 27531,5 \pm 159,1 | 28588,3 \pm 411,2 |
| 24 | 38843 \pm 714,6 | 43822,8 \pm 152,4 | 44431,5 \pm 291,2 |

Por último, a Día 3, la asociación de ES o CE con CpG (ODN1826) no modificó la Intensidad Media de Fluorescencia originada por CpG (ODN1826) en solitario (Tabla 110).

Tabla 110. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 3 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| Tiempo (h) | CpG (ODN1826) | CpG (ODN1826) + ES | CpG (ODN1826) + CE |
|------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 1699,3 \pm 504,6 | 1761 \pm 891 | 1553 \pm 373,7 |
| 2 | 5552,3 \pm 420,7 | 5727,8 \pm 2709,4 | 5964 \pm 1409,1 |
| 4 | 11910,8 \pm 710,7 | 12010,8 \pm 5182,2 | 11484,3 \pm 2818,9 |
| 5 | 14045,5 \pm 845,4 | 14315,5 \pm 6165,6 | 13980,3 \pm 3342,9 |
| 6 | 16845,3 \pm 926 | 17432 \pm 7365,2 | 17256,3 \pm 4194,9 |
| 7 | 18114,5 \pm 1086,4 | 18686,8 \pm 7880,9 | 18147 \pm 4289,4 |
| 8 | 19927,8 \pm 937,9 | 20738,3 \pm 8722,9 | 20132,3 \pm 4591,3 |
| 9 | 21602,5 \pm 1019,4 | 22476 \pm 9384,1 | 21746,5 \pm 5001,3 |
| 10 | 23041,5 \pm 1053,4 | 23929,5 \pm 9983,5 | 23364,5 \pm 5301,1 |
| 11 | 24457,8 \pm 928,2 | 25272,8 \pm 10471,8 | 24651 \pm 5433,4 |
| 24 | 37396,5 \pm 1098,8 | 38245,8 \pm 15036,3 | 37405,8 \pm 6515,3 |

5.2.2. Efectos de los antígenos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la capacidad proliferativas de esplenocitos extraídos de bazo de ratones C57BL/6

Los esplenocitos se estimularon con los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, solos o acompañados por LPS *E. coli* 026B6 o CpG (ODN1826), así como por estos dos en solitario. En paralelo se dejaron pocillos control con esplenocitos sin estimular.

A) Día 1

El día uno comprendió las primeras 24 h tras la adición de los antígenos correspondientes. A tiempo cero, se añadió la resazurina (1 mM). Se realizaron las lecturas de Intensidad de Fluorescencia a lo largo del tiempo y se obtuvieron los siguientes resultados.

A Día 1, la estimulación con ES o CE apenas originó modificaciones en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto al control sin estimular (Tabla 111).

Tabla 111. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 1 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | Control | ES | CE |
|------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| 2 | 6484 \pm 219 | 5920,3 \pm 389,8 | 6127 \pm 365,7 |
| 3 | 8840,3 \pm 304,2 | 8285 \pm 539,9 | 8539,3 \pm 338,4 |
| 4 | 11153 \pm 402,7 | 10641,8 \pm 332,3 | 10722,8 \pm 325,2 |
| 5 | 12912,8 \pm 352,8 | 12358 \pm 381,8 | 12160,5 \pm 625,7 |
| 6 | 14824,3 \pm 374,3 | 14146,8 \pm 346,4 | 14282,8 \pm 371,2 |
| 7 | 16382 \pm 386,8 | 15650,3 \pm 446,9 | 15413,3 \pm 234,1 |
| 8 | 18380 \pm 356,1 | 17826,8 \pm 374 | 18216,3 \pm 155 |
| 9 | 19426,5 \pm 308,5 | 18644,8 \pm 413 | 18425,5 \pm 415,7 |
| 17 | 31490 \pm 308,1 | 29903,5 \pm 721,8*** | 30048,3 \pm 470,6** |
| 18 | 31149,5 \pm 356,4 | 30141,8 \pm 330,1 | 30705,3 \pm 390,8 |
| 19 | 31805 \pm 423,6 | 31052,8 \pm 435,5 | 31508 \pm 349,3 |
| 20 | 31605,3 \pm 444,2 | 31176 \pm 352,5 | 31656,3 \pm 292,7 |
| 21 | 32393,5 \pm 495,1 | 32015,8 \pm 310,7 | 32658,3 \pm 378,3 |
| 22 | 32375,8 \pm 543,1 | 32008,8 \pm 470,3 | 32777,5 \pm 243,2 |
| 23 | 32715,5 \pm 553,1 | 32445,5 \pm 257 | 33290,5 \pm 263 |
| 24 | 34113,3 \pm 195,6 | 34409,3 \pm 318,7 | 34723,5 \pm 305,6 |

La asociación tanto de ES como de CE con LPS *E. coli* 026B6 ocasionó una disminución en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, siendo dicha disminución estadísticamente significativa para los tiempos indicados en la Tabla de la Tabla 112.

Tabla 112. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 1 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | LPS <i>E. coli</i> 026B6 | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + ES | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + CE |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 5527,5 \pm 283,7 | 5020,5 \pm 210 | 4697,5 \pm 387,8 |
| 3 | 8079,3 \pm 138,5 | 7248 \pm 378,3 | 7095 \pm 115,7 |
| 4 | 10107 \pm 150,7 | 9034 \pm 405,8 | 8900 \pm 535,2* |
| 5 | 11830,3 \pm 131 | 11255,5 \pm 328,4 | 10989,8 \pm 334 |
| 6 | 13861,5 \pm 274,8 | 12886 \pm 716 | 12839,3 \pm 249,5 |
| 7 | 14727 \pm 195,4 | 13590,3 \pm 354,7 | 13452,5 \pm 241,6* |
| 8 | 17958 \pm 139,8 | 17013 \pm 544,2 | 16788,5 \pm 368,7* |
| 9 | 18520 \pm 230,4 | 17423,5 \pm 363,2 | 17267 \pm 299,7* |
| 17 | 32825,3 \pm 925,2 | 31431,5 \pm 382** | 31482,8 \pm 488** |
| 18 | 33516 \pm 410,3 | 32108,3 \pm 619,4** | 32581,8 \pm 725,9 |
| 19 | 34435 \pm 317,5 | 32897,5 \pm 512,4** | 33571 \pm 434,4 |
| 20 | 34850,5 \pm 134 | 33392 \pm 552,5** | 33918,5 \pm 428,1 |
| 21 | 36064,3 \pm 253,8 | 34744,8 \pm 648,3* | 35211,5 \pm 389,8 |
| 22 | 36327,3 \pm 421,1 | 34979,8 \pm 593,5** | 35431,5 \pm 512,8 |
| 23 | 37084,3 \pm 213,7 | 35688,8 \pm 516*** | 36187,5 \pm 345,7*** |
| 24 | 39039,5 \pm 306,1 | 37756,3 \pm 681,8* | 38399,8 \pm 374,7 |

Por último, al combinar ES o CE con CpG (ODN1826) se produjo un descenso en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a CpG (ODN1826) solo en ambos casos (Tabla 113). Dicho descenso fue estadísticamente significativo para los tiempos indicados

Tabla 113. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 1 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativos respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | CpG (ODN1826) | CpG (ODN1826) + ES | CpG (ODN1826) + CE |
|------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2 | 5783 \pm 403,6 | 5433,3 \pm 121,9 | 4003 \pm 1286,1*** |
| 3 | 8427,8 \pm 538,4 | 7732,5 \pm 380,1 | 6168 \pm 1332,7*** |
| 4 | 10677 \pm 103,1 | 9739,5 \pm 299,2 | 8907,8 \pm 440,9*** |
| 5 | 12810,3 \pm 396,6 | 11705,8 \pm 499,1 | 10043,3 \pm 1543,6*** |
| 6 | 14928,8 \pm 385,3 | 13548,8 \pm 369,4** | 12450,8 \pm 1194,7*** |
| 7 | 15555 \pm 188,3 | 14464,5 \pm 557 | 13571,5 \pm 898,8*** |
| 8 | 18843,5 \pm 167,5 | 17438,3 \pm 545,4** | 16223,5 \pm 975,6*** |
| 9 | 19323,3 \pm 185,1 | 17983 \pm 446,1** | 16858 \pm 1103,8*** |
| 17 | 31304,5 \pm 210,6 | 28997,3 \pm 852,2*** | 28955,5 \pm 501,1*** |
| 18 | 31839,3 \pm 130,7 | 29691,5 \pm 783,7*** | 29991,3 \pm 523,7*** |
| 19 | 32859 \pm 58,1 | 30706 \pm 764,7*** | 30927,5 \pm 572,3*** |
| 20 | 32866,3 \pm 310,8 | 30835,5 \pm 781*** | 31197,5 \pm 642,3*** |
| 21 | 34124,5 \pm 284,8 | 31805 \pm 1020,8*** | 32092,3 \pm 719,5*** |
| 22 | 34126,8 \pm 448,3 | 31961,5 \pm 765,5*** | 32334,3 \pm 636,7*** |
| 23 | 34600,5 \pm 571,3 | 32584,5 \pm 925,3*** | 32607 \pm 654,2*** |
| 24 | 36618,8 \pm 624,1 | 34382,8 \pm 1031,4*** | 34426,3 \pm 638,1*** |

B) Día 2

El día dos incluyó todas aquellas lecturas realizadas en el periodo de tiempo comprendido entre las 24 y las 48 h tras la adición de los antígenos correspondientes. La resazurina se añadió tras 24 h de incubación de los esplenocitos en presencia de los antígenos a ensayar. Se realizaron las lecturas de Intensidad de Fluorescencia a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos se recogen a continuación.

En primer lugar, la estimulación de los esplenocitos con ES o CE ocasionó un incremento en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto al control sin estimular a Día 3. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para los tiempos indicados en la Tabla de la Tabla 114.

Tabla 114. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 2 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | Control | ES | CE |
|------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| 1 | 1124,3 \pm 188,2 | 1189,5 \pm 211,8 | 570 \pm 132,9 |
| 2 | 3724,3 \pm 250,3 | 3005,8 \pm 306,8 | 2291 \pm 445,6** |
| 3 | 5926,3 \pm 220,6 | 5558 \pm 143,4 | 5224 \pm 753,1 |
| 4 | 7423,5 \pm 279,5 | 7386,5 \pm 219,3 | 6838 \pm 210,7 |
| 5 | 9153 \pm 352,1 | 8993 \pm 156,4 | 9060,5 \pm 136,4 |
| 6 | 10056,3 \pm 242 | 10030,3 \pm 272,5 | 10119 \pm 361,7 |
| 7 | 11350,8 \pm 228,4 | 11556,5 \pm 160,2 | 11875,3 \pm 235,7 |
| 8 | 12895 \pm 340,7 | 12806,5 \pm 192,7 | 13136 \pm 369,6 |
| 9 | 14102 \pm 271,6 | 14052,8 \pm 201,1 | 14500,3 \pm 360,8 |
| 10 | 15285,8 \pm 280,8 | 15156,8 \pm 247,4 | 15679,8 \pm 338,5 |
| 11 | 16063,5 \pm 640,4 | 15863,8 \pm 210,2 | 16393,8 \pm 584,5 |
| 12 | 16768,5 \pm 280,5 | 17104,8 \pm 216,1 | 17652,3 \pm 438,4 |
| 13 | 17497,8 \pm 218,7 | 17990 \pm 262,6 | 18617,3 \pm 402,2* |
| 14 | 18503,3 \pm 299,3 | 19046,5 \pm 319,6 | 19786,5 \pm 455,1** |
| 24 | 27922,3 \pm 575 | 29013,3 \pm 333,7 | 29449,5 \pm 1175,6*** |

La asociación tanto de ES como de CE con LPS *E. coli* 026B6 originó un descenso en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario. Dicha disminución fue estadísticamente significativa para los tiempos indicados (Tabla 115).

Tabla 115. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 2 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | LPS <i>E. coli</i> 026B6 | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + ES | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + CE |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1052,5 \pm 224 | 450,8 \pm 159,2 | 615,5 \pm 204,2 |
| 2 | 3186,3 \pm 611,1 | 2902,5 \pm 738,4 | 2856,8 \pm 179,2 |
| 3 | 6893,8 \pm 693,7 | 6362,8 \pm 627,8 | 6592,5 \pm 570,1 |
| 4 | 9475 \pm 288,8 | 8386,8 \pm 288,4 | 8667 \pm 467,3 |
| 5 | 12588 \pm 345,1 | 11163,3 \pm 292,4** | 11478,8 \pm 681,2*** |
| 6 | 14063 \pm 139,5 | 12218 \pm 580,4*** | 12598,3 \pm 483,2** |
| 7 | 16966,8 \pm 173,5 | 15368,5 \pm 805,5*** | 15806,8 \pm 469,9* |
| 8 | 18717 \pm 150,6 | 16984 \pm 811,5*** | 17421,3 \pm 744,4** |
| 9 | 20603,8 \pm 126 | 18728,3 \pm 801,6*** | 19155,3 \pm 914,1** |
| 10 | 22427,3 \pm 382,7 | 20057,3 \pm 751,9*** | 20766,3 \pm 1189,1*** |
| 11 | 23377 \pm 243,3 | 20867,8 \pm 808,5*** | 21404 \pm 973,8*** |
| 12 | 24891 \pm 289,6 | 22399,5 \pm 821,9*** | 23023,8 \pm 884,6*** |
| 13 | 26426,3 \pm 35,3 | 24201,5 \pm 858,3*** | 24587 \pm 1010,1*** |
| 14 | 28119,5 \pm 257,8 | 25658 \pm 678,5*** | 26265,8 \pm 1025,8*** |
| 24 | 40003,5 \pm 380,2 | 37017,5 \pm 1224,5*** | 37907,3 \pm 1238,6*** |

Por último, a Día 2, la asociación de CE con CpG (ODN1826) incrementó la Intensidad Media de Fluorescencia al inicio del experimento respecto a CpG (ODN1826) solo, el cual fue estadísticamente significativo tal y como se muestra en la Tabla 116. Sin embargo, después, a medida que transcurrió el tiempo la Intensidad Media de Fluorescencia tendió a igualarse tanto al asociar ES como CE a CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo.

Tabla 116. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 2 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | CpG (ODN1826) | CpG (ODN1826) + ES | CpG (ODN1826) + CE |
|------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 406 \pm 43,5 | 395,3 \pm 37,4 | 778,3 \pm 423 |
| 2 | 2199,3 \pm 413,3 | 2251,8 \pm 391,6 | 3438,8 \pm 237,9* |
| 3 | 5036 \pm 659 | 5836 \pm 1098,3 | 6462,5 \pm 420,8** |
| 4 | 7558 \pm 626,4 | 7422,3 \pm 261,5 | 8350,8 \pm 637,3 |
| 5 | 10180 \pm 225 | 9820 \pm 552,5 | 10480,3 \pm 395,9 |
| 6 | 11415 \pm 61,1 | 11101,5 \pm 405,8 | 11846,3 \pm 558,1 |
| 7 | 14009,8 \pm 415,8 | 14000,5 \pm 125,7 | 14057,8 \pm 201,6 |
| 8 | 15640 \pm 264,8 | 15461,5 \pm 92,8 | 15635,8 \pm 282,4 |
| 9 | 17070,3 \pm 352,2 | 17043,3 \pm 245,2 | 17106 \pm 192,1 |
| 10 | 18568,5 \pm 291,7 | 18478,8 \pm 296,1 | 18557,8 \pm 420,5 |
| 11 | 18942,8 \pm 201,7 | 18877,3 \pm 387,5 | 18856,8 \pm 328,7 |
| 12 | 20233,3 \pm 334,6 | 20075,8 \pm 451,8 | 20424,8 \pm 447,1 |
| 13 | 21940,5 \pm 249,3 | 21797 \pm 406,3 | 22109,3 \pm 492,5 |
| 14 | 23079,5 \pm 358,5 | 23151,3 \pm 429,5 | 23304,5 \pm 356,9 |
| 24 | 32276,8 \pm 396,9 | 32791 \pm 711 | 32725,3 \pm 402,9 |

D) Día 3

El día tres incluyó todas aquellas lecturas realizadas en el periodo de tiempo comprendido entre las 48 y las 72 h tras la adición de los antígenos correspondientes. La resazurina se añadió tras 48 h de incubación de los esplenocitos en presencia de los antígenos a ensayar. Se realizaron las lecturas de Intensidad de Fluorescencia a lo largo del tiempo y se obtuvieron los resultados siguientes.

A Día 3, la estimulación con ES o CE dio lugar a un incremento en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto al control sin estimular. Dicho incremento fue estadísticamente significativo para los tiempos que se indican en la Tabla 117.

Tabla 117. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 3 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | Control | ES | CE |
|------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | 1089,5 \pm 190,2 | 752,8 \pm 112,4 | 891,5 \pm 351,1 |
| 2 | 2654,8 \pm 93,6 | 2880,3 \pm 95,8 | 3175,3 \pm 933,3 |
| 4 | 6836,8 \pm 174,3 | 7362,1 \pm 176,5 | 7435,1 \pm 2002,6 |
| 5 | 6210 \pm 124,9 | 7143,5 \pm 143,2 | 8208,5 \pm 2357,8 |
| 6 | 7377,3 \pm 268,4 | 8707,3 \pm 158 | 10042,8 \pm 2916,1 |
| 7 | 7955 \pm 302,5 | 9239,5 \pm 117,2 | 10663,5 \pm 3178,6 |
| 8 | 8891,5 \pm 332 | 10552,8 \pm 139,2 | 12233,3 \pm 3624* |
| 9 | 9779 \pm 422,9 | 11615,3 \pm 166,2 | 13465,3 \pm 3905,5** |
| 10 | 10438,8 \pm 381,2 | 12554 \pm 192,3 | 14488,8 \pm 4321,5** |
| 11 | 11127,3 \pm 447 | 13252,8 \pm 170,5 | 15336 \pm 4600,3** |
| 24 | 19769,5 \pm 694,1 | 24192,3 \pm 418,1*** | 27262,5 \pm 7595,5*** |

Por su parte, la asociación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 apenas dio lugar a cambios en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a LPS *E. coli* 026B6 en solitario (Tabla 118).

Tabla 118. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 3 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

| Tiempo (h) | LPS <i>E. coli</i> 026B6 | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + ES | LPS <i>E. coli</i> 026B6 + CE |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1657 \pm 363,5 | 1511,5 \pm 319,2 | 1771,5 \pm 398,7 |
| 2 | 7071,5 \pm 524,5 | 6412,5 \pm 610,3 | 7437,5 \pm 269,4 |
| 4 | 9388,2 \pm 347,5 | 8921,4 \pm 466,2 | 8780,8 \pm 581 |
| 5 | 17514,3 \pm 434,6 | 16389,8 \pm 516,4 | 17402,3 \pm 691,6 |
| 6 | 20858,8 \pm 265 | 20209,8 \pm 537,7 | 21049 \pm 671,7 |
| 7 | 22090,3 \pm 182,2 | 21240,5 \pm 379,1 | 22140,5 \pm 560 |
| 8 | 24851 \pm 287,3 | 24164 \pm 494,2 | 25223,3 \pm 612,1 |
| 9 | 27147,8 \pm 435,7 | 26285,3 \pm 451,6 | 27313,8 \pm 646 |
| 10 | 28872,3 \pm 412,2 | 27925,8 \pm 477,3 | 29013 \pm 789,3 |
| 11 | 30191,8 \pm 363,6 | 29165 \pm 407,5 | 30347,8 \pm 537 |
| 24 | 44993,5 \pm 492,5 | 43403,8 \pm 418,4 | 44693,5 \pm 625,7 |

A Día 3, la asociación de ES o CE con CpG (ODN1826) produjo un leve incremento en la Intensidad Media de Fluorescencia respecto a CpG (ODN1826) solo, que solo fue estadísticamente significativa para CE en combinación con CpG (ODN1826) a tiempo 2 h (Tabla 119).

Tabla 119. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 3 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuádruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

| Tiempo (h) | CpG (ODN1826) | CpG (ODN1826) + ES | CpG (ODN1826) + CE |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 669 \pm 147,7 | 500,5 \pm 156,5 | 731,3 \pm 188 |
| 2 | 2838,3 \pm 444,6 | 2956,5 \pm 265,7 | 3654,5 \pm 339,1 |
| 4 | 8653,4 \pm 600,6 | 5793 \pm 483 | 5445,8 \pm 488,5* |
| 5 | 7937 \pm 894,7 | 8153,8 \pm 549,9 | 8350 \pm 837,4 |
| 6 | 9689,3 \pm 876,4 | 10074,8 \pm 862,2 | 10330,8 \pm 799,9 |
| 7 | 10161,3 \pm 939,7 | 10649,8 \pm 839,2 | 10844,5 \pm 845,5 |
| 8 | 11959,5 \pm 1186 | 12508,8 \pm 927,6 | 12627 \pm 1086,1 |
| 9 | 13185 \pm 1363,1 | 13996,3 \pm 1165,6 | 14146,8 \pm 998,8 |
| 10 | 14214,3 \pm 1516,6 | 15177 \pm 1181,6 | 15237 \pm 1106,3 |
| 11 | 14987 \pm 1578,8 | 15848,5 \pm 1192,7 | 16095,3 \pm 1237,4 |
| 24 | 28334,5 \pm 2075,7 | 29284 \pm 1609,5 | 29279,8 \pm 1493,7 |

Por último, a modo de resumen, a continuación se recogen las curvas de crecimiento de los esplenocitos a lo largo del tiempo, en función de los antígenos empleados, tanto en ratones BALB/c (Figura 161) como en C57BL/6 (Figura 162).

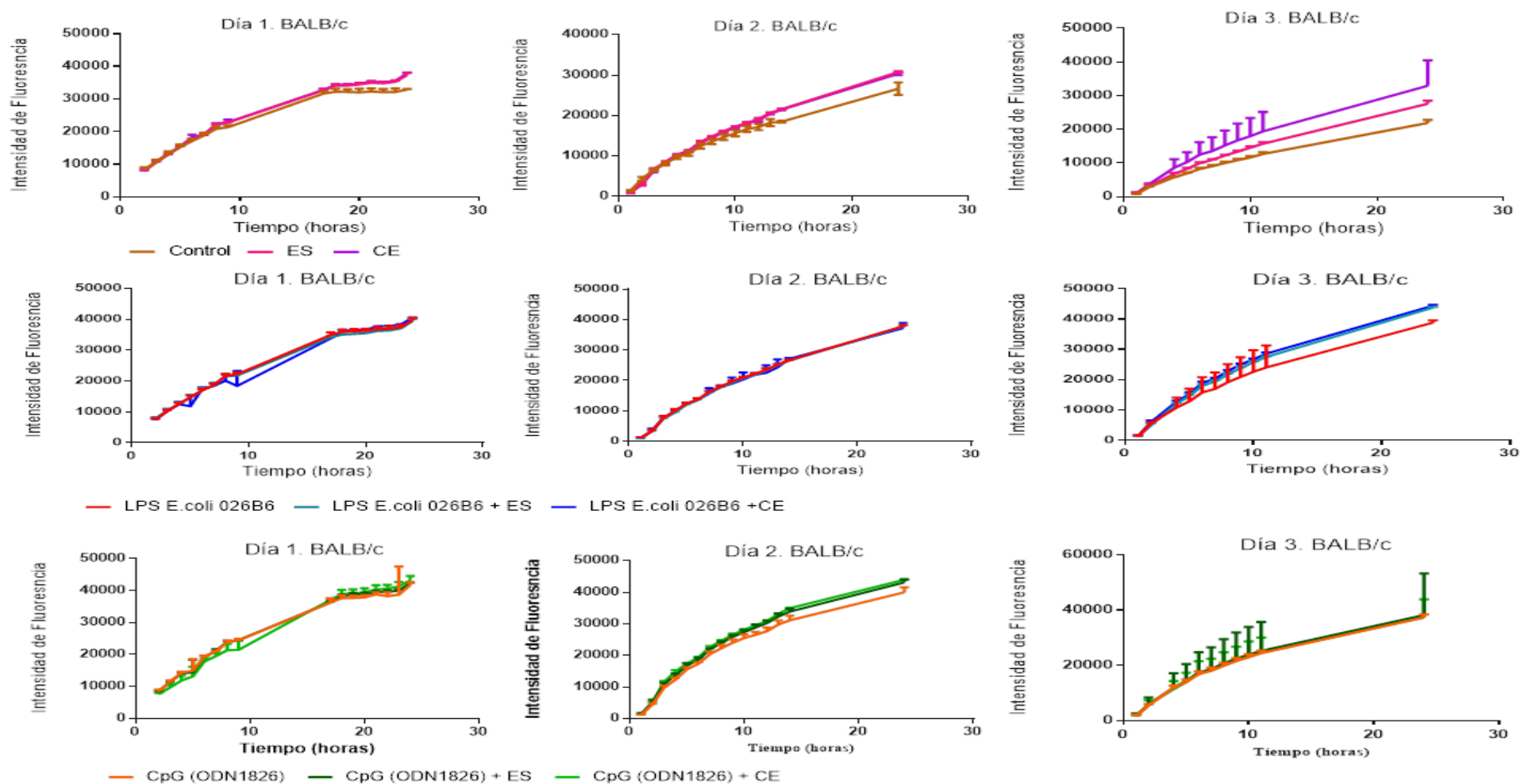


Figura 161. Muestra la Intensidad de Fluorescencia media y su desviación estándar para cada uno de los tiempos ensayados, en función de los estímulos empleados en cada caso, en ratones BALB/c. ES, antígeno secretor-excretor de *Anisakis simplex*; CE, antígeno total de *A. simplex*.

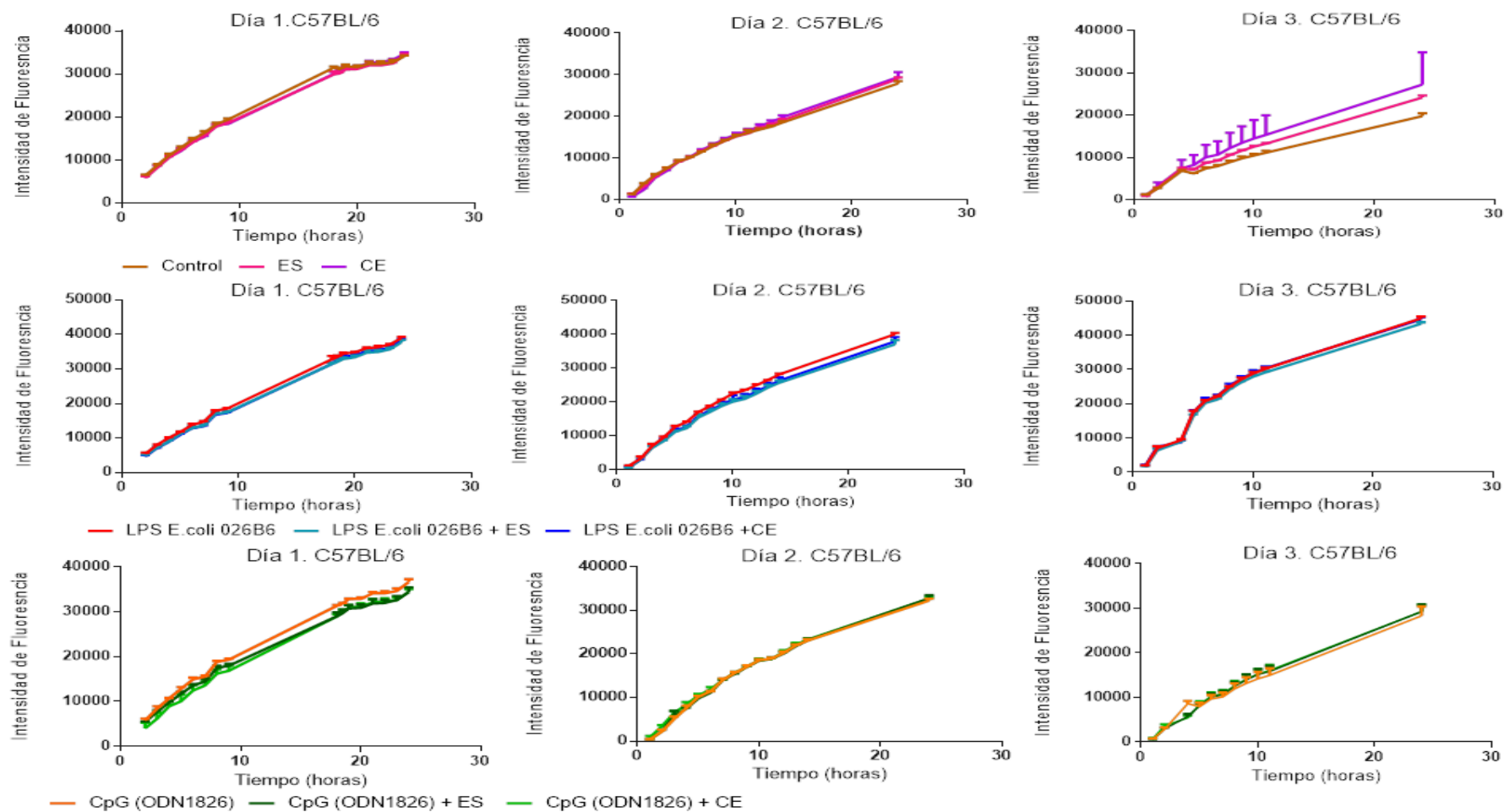


Figura 162. Muestra la Intensidad de Fluorescencia media y su desviación estándar para cada uno de los tiempos ensayados, en función de los estímulos empleados en cada caso, en ratones C57BL/6. ES, antígeno secretor-excretor de *Anisakis simplex*; CE, antígeno total de *A. simplex*.

6. ANTICUERPOS ANTI-*Anisakis simplex* EN SUERO DE INDIVIDUOS SANOS: SU RELACIÓN CON CÉLULAS T $\gamma\delta$ Y $\alpha\beta$

6.1. Población de estudio

Se analizaron 132 sujetos sanos seleccionados, por el Dr. Juan Carlos Andreu Ballester, entre los familiares de pacientes ingresados en el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia (España), así como de los propios trabajadores del Hospital. De los 132 sujetos, 69 fueron varones (52,3%) y 63 mujeres (47,7%). La media de edad fue de 63,1±20,6 y 59,1±18,1 años en varones y mujeres, respectivamente.

6.2. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex*

En la Tabla 120 se muestran los valores medios de los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* presentes.

Tabla 120. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en función del género en individuos sanos. Los resultados están expresados en Absorbancias (490 nm). Para poder comparar cada uno de los isotipos, se calcularon los logaritmos de las Absorbancias tras multiplicarlos por 10 (IgS, IgG, IgM y IgA; dilución 1/100) o por 500 (IgE; dilución 1/2). IgS: inmunoglobulinas totales. N.S.: no significativo. Media ± desviación estándar. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | Varones | Mujeres | Valor <i>p</i> |
|------------|-------------|--------------------|----------------|
| IgS | 0,651±0,364 | 0,692± 0,241 | N.S |
| IgG | 0,844±0,505 | 0,808±0,453 | N.S. |
| IgM | 0,806±0,494 | 0,904±0,511 | < 0,001 |
| IgA | 0,674±0,471 | 0,723±0,520 | N.S. |
| IgE | 0,778±0,954 | 0,813±0,903 | N.S. |

Se observaron niveles de IgM específica significativamente superiores en el grupo de mujeres en comparación con el grupo de hombres. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos para el resto de anticuerpos estudiados.

Los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* se correlacionaron negativamente con la edad en el caso de las inmunoglobulinas totales e IgM (Spearman rho, -0,320, $p<0,001$ y Spearman rho, -0,373, $p<0,001$, respectivamente). De acuerdo con los grupos de edad (Tabla 121), los niveles de inmunoglobulinas totales anti-*A. simplex* fueron superiores en los sujetos menores de 55 años, y disminuyeron de forma significativa a partir de esa edad (56–75 años, $p=0,008$ y 76–95 años, $p=0,005$). Este descenso fue más marcado en el caso de los niveles de IgM anti-*A. simplex*, con diferencias significativas para los grupos de 56-75 años ($p=0,021$) y 76-95 años ($p=0,002$) en comparación con los grupos de edad más jóvenes (Test de Kruskal-Wallis).

Tabla 121. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en función de los grupos de edad. 15–35 años (N = 23), 36–55 (N = 28), 56–75 (N = 46), 76–95 (N = 35). Los resultados están expresados en Absorbancias (490 nm). Para poder comparar cada uno de los isotipos, se calcularon los logaritmos de las Absorbancias tras

multiplicarlos por 10 (IgS, IgG, IgM e IgA; dilución 1/100) o por 500 (IgE; dilución 1/2). IgS: inmunoglobulinas totales. N.S.: no significativo. Media \pm desviación estándar. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

| | 15-35 | 36-55 | 65-75 | 76-95 |
|------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| IgS | 0,744 \pm 0,279 | 0,728 \pm 0,362 | 0,628 \pm 0,230 | 0,621 \pm 0,322 |
| IgG | 0,811 \pm 0,462 | 0,816 \pm 0,477 | 0,795 \pm 0,398 | 0,877 \pm 0,568 |
| IgM | 0,914 \pm 0,447 | 0,923 \pm 0,505 | 0,839\pm0,556 | 0,766\pm0,431 |
| IgA | 0,610 \pm 0,255 | 0,766 \pm 0,591 | 0,688 \pm 0,505 | 0,706 \pm 0,491 |
| IgE | 0,477 \pm 0,699 | 0,602 \pm 0,699 | 0,903 \pm 0,699 | 0,778 \pm 1,000 |

Sin embargo, para el caso concreto de IgG e IgE se observó el efecto contrario. Los niveles de IgE específica anti-*A. simplex* aumentaron significativamente en el grupo de edad de 56-75 años respecto al resto de grupos ($p=0,044$).

Por su parte, los niveles de IgG específica anti-*A. simplex* aumentaron en el grupo de edad de 76-95 años y fue cercano a la significancia estadística ($p=0,066$).

Los niveles de IgA anti-*A. simplex* se alzaron de manera discreta en el grupo de edad de 36-55 años, pero sin significancia estadística alguna (Test de Kruskal-Wallis).

6.3. Correlación de linfocitos T $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ y B con los niveles de anticuerpos específicos anti-*Anisakis simplex*

Se realizó un análisis estadístico de los niveles de linfocitos T en relación con los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex*. Tal y como se describe en la Tabla 122, todos los isotipos de anticuerpos estudiados se correlacionaron negativamente con los niveles de células NKT a excepción de los niveles de IgG anti-*A. simplex*. Por otro lado, la expresión de CD19 se correlacionó positivamente con los niveles de IgM específica en suero.

Tabla 122. Correlaciones entre células NKT y linfocitos B, con los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex*. Se empleó el Test de la rho de Spearman. IgS: inmunoglobulinas totales.

| | CD3+CD56+ | CD3+CD56+ $\alpha\beta$ + | CD3+CD56+ $\gamma\delta$ + | CD19+ |
|----------------|---------------|---------------------------|----------------------------|---------------|
| Ig's | -0,443 | -0,292 | -0,280 | - |
| Valor <i>p</i> | <0,001 | 0,001 | 0,002 | - |
| IgM | -0,439 | -0,247 | -0,214 | +0,250 |
| Valor <i>p</i> | <0,001 | 0,005 | 0,018 | 0,004 |
| IgE | -0,234 | - | - | - |
| Valor <i>p</i> | 0,034 | - | - | - |
| IgA | -0,227 | -0,301 | -0,190 | - |
| Valor <i>p</i> | 0,009 | <0,001 | 0,036 | - |

6.4. Niveles positivos de anticuerpos frente *Anisakis simplex* y linfocitos T

Con objeto de comparar los valores medios de las variables cuantitativas, se dividieron los sujetos en dos grupos, de acuerdo a los niveles de anticuerpo anti-*A. simplex*. De los 132 individuos incluidos en el estudio, aquellos que presentaron valores de anticuerpos anti-*A. simplex* superiores a la media de la Densidad Óptica (DO) más una vez su desviación estándar respectiva, para cada una de las inmunoglobulinas, fueron considerados positivos.

Los porcentajes de positividad para inmunoglobulinas totales (IgS), IgG, IgM, IgE e IgA fueron 15,2%, 12,9%, 11,4%, 6,8% y 16,7%, respectivamente. Las frecuencias significativas de los linfocitos T en cuanto a la positividad o negatividad de anticuerpos anti-*A. simplex* se muestran en la Figura 163.

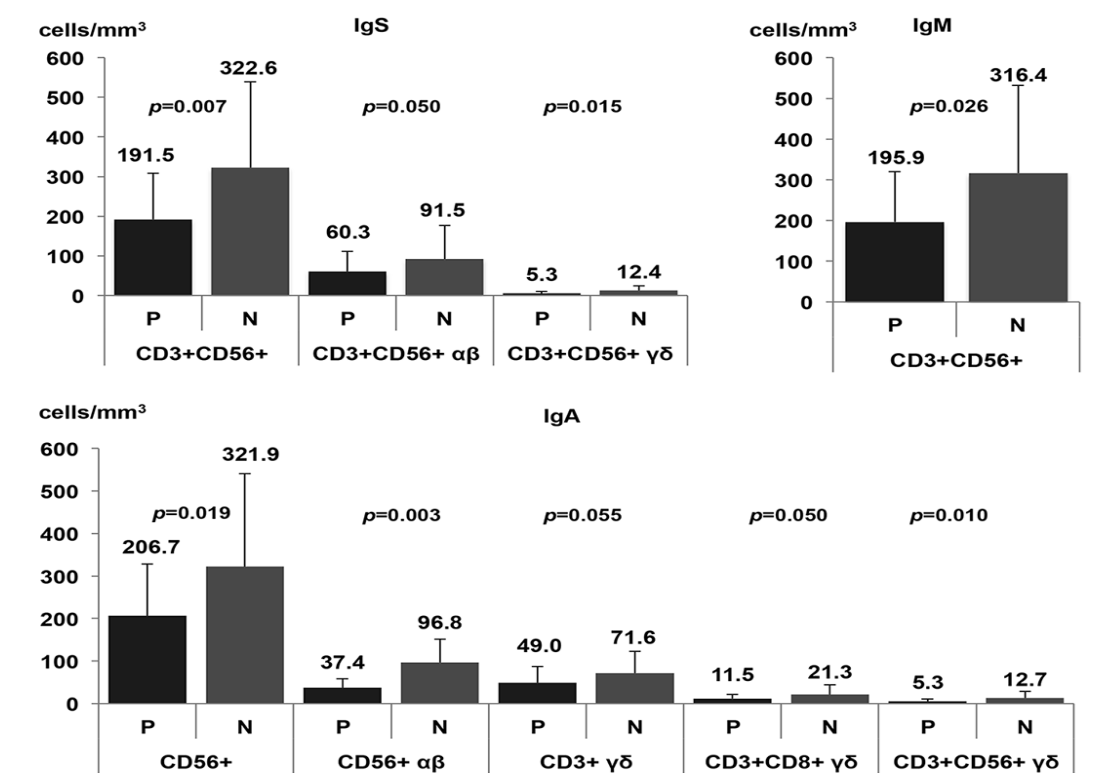


Figura 163. Muestra la frecuencia de los distintos subtipos de linfocitos T en función de las inmunoglobulinas anti-*Anisakis simplex*: IgS, IgA e IgM positivas (P) y negativas (N), así como su significancia estadística. Los valores de células T están expresados en células/mm³. Valor *p*, Test de U de Mann-Whitney.

La positividad de los anticuerpos anti-*A. simplex* se relacionó con el descenso de células CD56+αβ así como de todos los subtipos de LTγδ, especialmente en el caso de IgA anti-*A. simplex*.

En cuanto a los linfocitos B, se observó un incremento considerable en la frecuencia de células CD19+ para el grupo con niveles detectables de IgM anti-*A. simplex*, que fue cercana a la significancia ($p=0,051$) (Tabla 123). El resto de niveles de anticuerpos no afectaron al número de células B.

Tabla 123. Frecuencia de linfocitos B CD19+ en función de los anticuerpos anti-*Anisakis simplex* positivos y negativos. Los linfocitos B están expresadas en células/mm³. Media \pm Desviación estándar. Test de U de Mann-Whitney. IgS: inmunoglobulinas totales.

| (N=Positiva) | Positiva | Negativa | Significancia (p) |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| IgS (20) | 251,0 \pm 131,4 | 215,5 \pm 144,1 | 0,198 |
| IgG (17) | 194,6 \pm 117,9 | 224,7 \pm 145,7 | 0,519 |
| IgM (15) | 260,0 \pm 98,7 | 215,8 \pm 146,6 | 0,051 |
| IgE (9) | 221,9 \pm 174,8 | 220,8 \pm 140,6 | 0,738 |
| IgA (22) | 232,8 \pm 153,3 | 218,5 \pm 140,7 | 0,700 |

Al dividir los sujetos participantes en el estudio en dos grupos (positivo y negativo), de acuerdo a sus niveles de anticuerpos anti-*A. simplex*, el ratio para las poblaciones CD56+ $\gamma\delta$ + /CD3+ (0,0083 \pm 0,0106) en el grupo negativo fue significativamente superior que el del grupo positivo (0,0036 \pm 0,0036) ($p=0,019$). Cabe destacar el caso concreto de IgA específica anti-*A. simplex*, en la cual se encontró un aumento en el ratio de CD56+ $\gamma\delta$ + /CD3+ del grupo negativo en comparación con el grupo positivo (0,0084 \pm 0,0108 y 0,0038 \pm 0,0034, respectivamente) ($p=0,001$). Además, los pacientes pertenecientes al grupo negativo para la IgA presentaron un ratio de CD8+ $\gamma\delta$ + /CD3+ superior al grupo positivo (0,0131 \pm 0,0135 y 0,0088 \pm 0,0072, respectivamente) ($p=0,039$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de anticuerpos específicos testados.

7. ANTICUERPOS ANTI-*Anisakis simplex* EN SUERO DE PACIENTES CON SEPSIS

En la Tabla 124 se muestran las características de los 114 pacientes con sepsis que formaron el estudio y que fueron seleccionados por el Dr. Juan Carlos Andreu Ballester. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la media de edad del grupo de pacientes sépticos (65,5 \pm 20,9) y el grupo control (63,1 \pm 21,2) ($p=0,413$). De los controles sanos, 73 de 97 eran varones (64,9%) y 34 mujeres (35,1%), *versus* 67 (58,8%) y 47 (41,2%), respectivamente, en el grupo de pacientes con sepsis.

Tabla 124. Características de los pacientes con sepsis. N=114. *Al menos un paciente con alguno de los siguientes diagnósticos: abscesos, celulitis, enfermedad pélvica inflamatoria, gangrena, malaria, isquemia intestinal, obstrucción intestinal, pancreatitis aguda, peritonitis primaria o artritis séptica. D.E.: Desviación estándar.

| | Media \pm D.E. |
|---------------------------------------|------------------|
| Edad | 65,5 \pm 20,9 |
| Índice APACHE II | 13,8 \pm 7,1 |
| Índice SOFA | 4,4 \pm 3,7 |
| PCR | 205 \pm 131 |
| Procalcitonina | 18,5 \pm 23,4 |
| Ácido láctico | 2,1 \pm 1,5 |
| Número (%) de pacientes | |
| Sexo | |
| - Varones | 67 (58,8) |
| - Mujeres | 47 (41,2) |
| Servicio de Emergencias | 61 (53,5) |
| Unidad de Cuidados Intensivos | 53 (46,5) |
| Fases de la Sepsis | |
| -Sepsis | 40 (35,1) |
| -Sepsis Severa | 50 (43,9) |
| - Shock Séptico | 24 (21,1) |
| Cultivos Positivos † | 48 (42,1) |
| Muerte intra-hospitalaria | 19 (16,7) |
| Diagnóstico | |
| - Neumonía | 53 (46,5) |
| - Infección del Tracto Urinario | 24 (21,0) |
| - Apendicitis aguda | 6 (5,3) |
| - Colecistitis aguda | 6 (5,3) |
| - Colangitis aguda | 4 (3,5) |
| - No determinado | 3 (2,6) |
| - Diverticulitis aguda | 3 (2,6) |
| - Meningitis | 3 (2,6) |
| - Enterocolitis | 2 (1,8) |
| - Otras* | 10 (8,8) |
| Fallo orgánico | |
| Fallo Respiratorio agudo | 43 (37,7) |
| Fallo Renal agudo | 34 (29,8) |
| Fallo Neurológico | 30 (26,3) |
| Shock | 24 (21,1) |
| Fallo Metabólico | 22 (19,3) |
| Fallo Hepático agudo | 18 (15,8) |
| Hematológico | 18 (15,8) |
| Número de órganos afuncionales | |
| 0 | 44 (38,6) |
| 1 | 16 (14,0) |
| 2 | 20 (17,5) |
| 3 | 18 (15,8) |
| 4 o más | 16 (14,0) |

7.1. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* según la severidad del cuadro séptico

En la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* mediante ELISA, se detectaron niveles de inmunoglobulinas totales específicas (IgS) muy similares entre el grupo control y el grupo de sepsis que no presentó complicaciones orgánicas. Sin embargo, al comparar el grupo de pacientes con sepsis severa ($p=0,001$) y el grupo con shock séptico ($p< 0,0001$), se observaron niveles de anticuerpos significativamente inferiores sobre todo en este último.

Se produjo un descenso similar en el caso de la IgM específica anti-*A. simplex*. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control/sepsis no complicada, *vs* sepsis severa ($p=0,016$) y shock séptico ($p=0,002$). Estas diferencias se dieron igualmente en el caso de la IgA específica ($p=0,004$ y $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 164 A). En cuanto a los niveles de IgE, los niveles más bajos se detectaron en el grupo de shock séptico ($p=0,003$) (Figura 164 B).

Al medir los niveles de IgG anti-*A. simplex*, los resultados fueron diferentes a aquellos obtenidos al testar el resto de isotipos específicos. Los valores de IgG anti-*A. simplex* se incrementaron significativamente en los pacientes con shock séptico en comparación con el grupo control ($p=0,038$) (Figura 164 C). Igualmente, los porcentajes de positividad para IgG anti-*A. simplex* se elevaron de acuerdo a la severidad de la enfermedad (Figura 164 D).

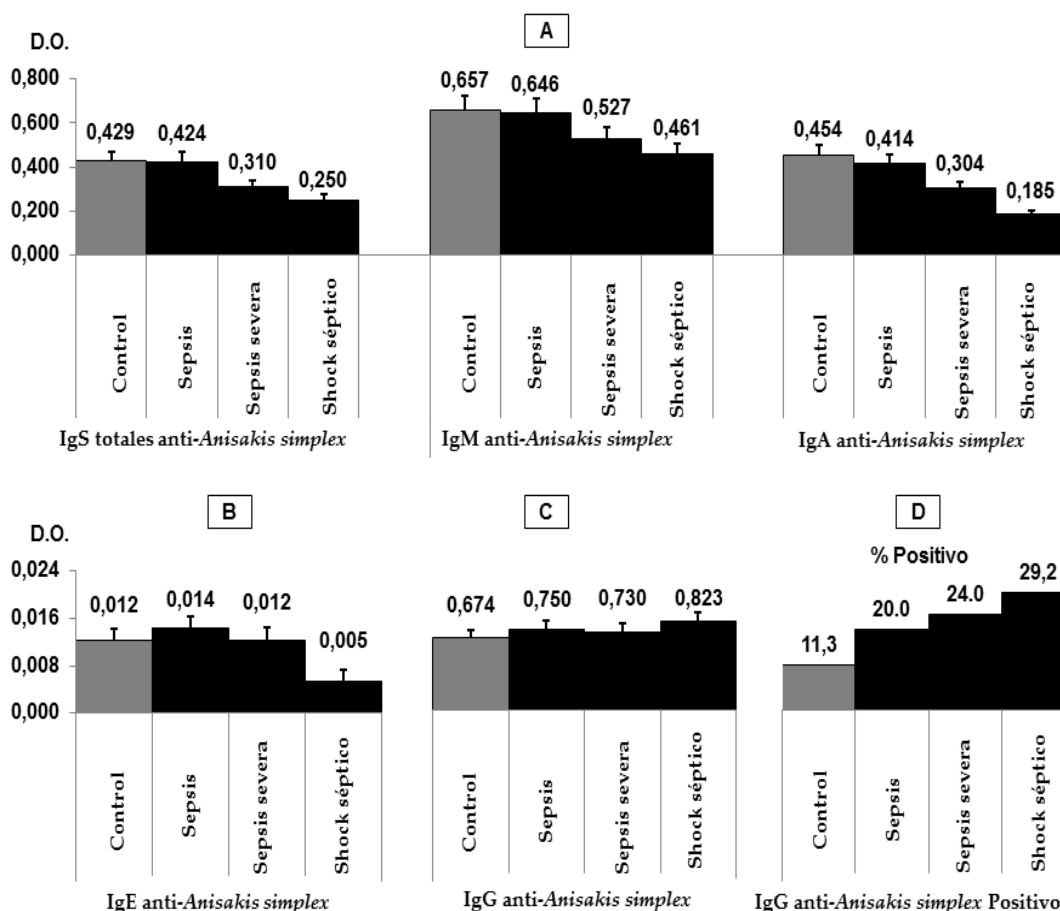


Figura 164. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en función de la severidad del cuadro séptico (**panel A, B y C**), y el grado de positividad (%) de IgG anti-*A. simplex* (**panel D**). Control (n=97), Sepsis (n=40), Sepsis Severa (n=50), Shock séptico (n=24). **Panel A:** Para IgS anti-*Anisakis* totales, se hallaron diferencias significativas entre los grupos control-sepsis y sepsis severa, $p=0,001$; el grupo de sepsis y el grupo de shock séptico, $p<0,0001$. Para IgM anti-*A. simplex*, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control-sepsis y el grupo de sepsis severa, $p=0,016$; el grupo control-sepsis y el grupo de shock séptico, $p=0,002$. Para IgA, se determinaron diferencias significativas entre el grupo control-sepsis y el grupo de sepsis severa, $p=0,004$; el grupo de control-sepsis y el grupo de shock séptico, $p<0,0001$. **Panel B:** Para IgE, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de shock séptico y otros, $p=0,003$. **Panel C:** Para IgG, se determinaron diferencias significativas entre los grupos de shock séptico y otros, $p=0,038$.

7.2. Correlación entre los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* con los subtipos de linfocitos T y los marcadores de severidad

Se observaron correlaciones positivas entre los niveles de IgA anti-*A. simplex* y todos los subtipos de células T $\gamma\delta$, tal y como se describe a continuación (correlación de Pearson): CD3+ $\gamma\delta$ (+0,312, $p<0,001$); CD3+ CD8+ $\gamma\delta$ (+0,267, $p=0,004$) y CD3+ CD56+ $\gamma\delta$ (+0,282, $p=0,002$) (Figura 165A). Sin embargo, se encontraron correlaciones negativas entre los niveles de IgA anti-*A. simplex* y el tiempo previo a la admisión (-0,305, $p=0,001$), índice APACHE (-0,317, $p<0,001$) e índice SOFA (-0,333, $p<0,001$) (Figura 166 B).

Al mismo tiempo, los niveles de IgM anti-A. *simplex* se correlacionaron también negativamente con la procalcitonina (-0,467, $p < 0,016$), índice APACHE (-0,435, $p < 0,001$) e índice SOFA (-0,325, $p < 0,001$) (Figura 166 B).

Por su parte, los niveles de IgG anti-A. *simplex* presentaron una correlación positiva con el ácido láctico (+0,307, $p < 0,001$), la procalcitonina (+0,412, $p < 0,001$) y la PCR (+0,527, $p < 0,001$) (Figura 165 A).

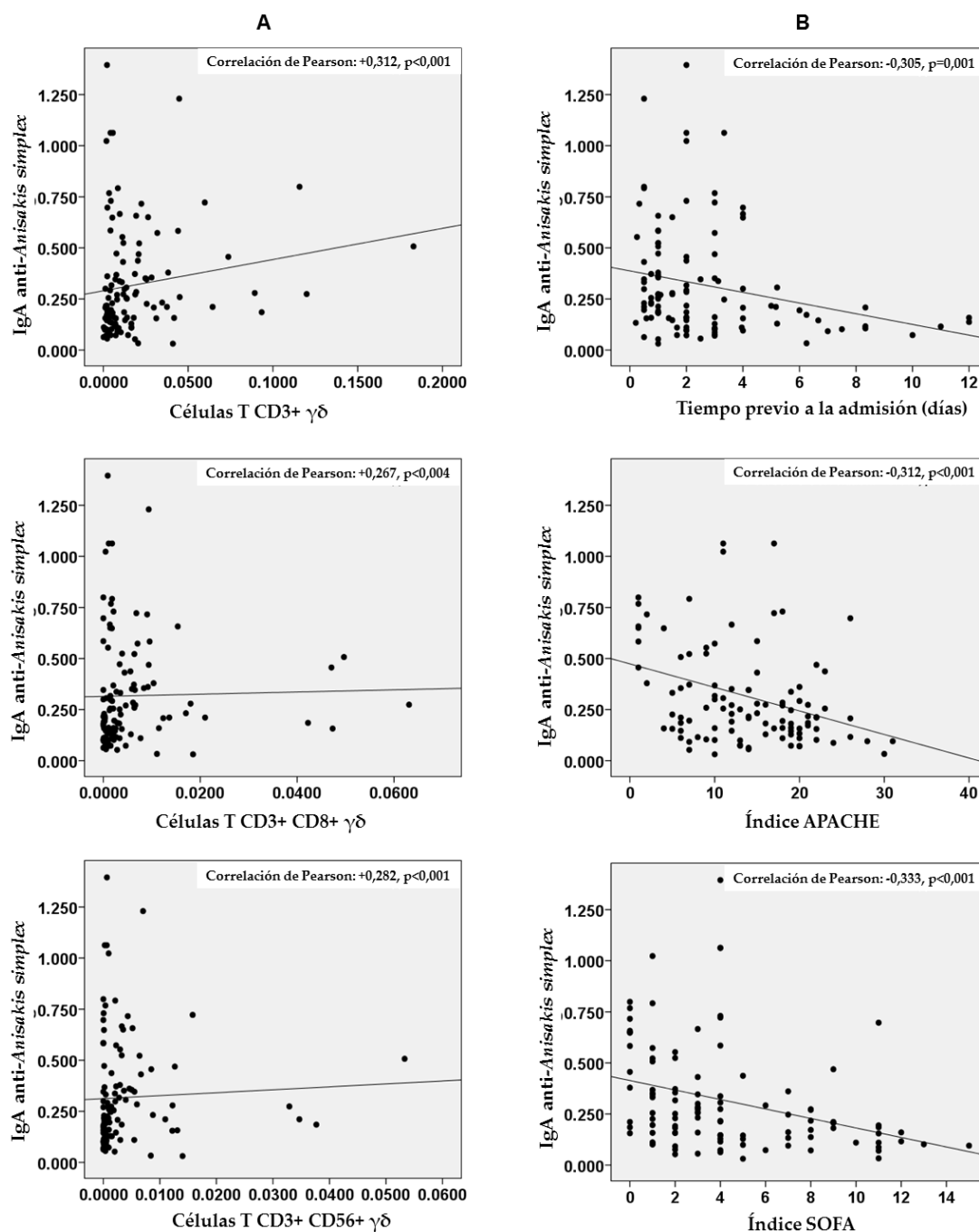


Figura 165. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgA anti-*Anisakis simplex* con células T $\gamma\delta$ y el tiempo previo a la admisión, así como los índices APACHE y SOFA en pacientes sépticos.

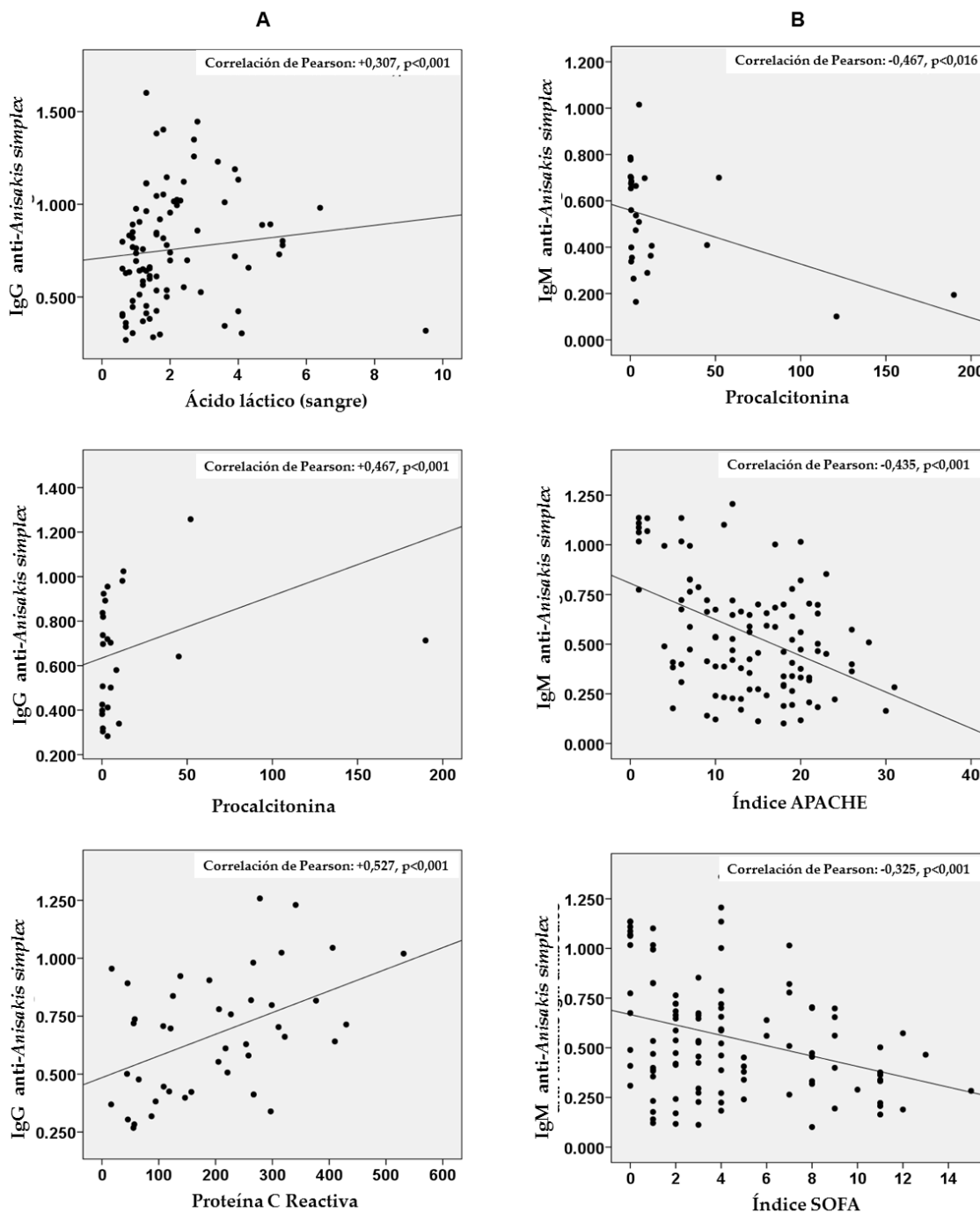


Figura 166. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-*Anisakis simplex* con los correspondientes biomarcadores e índices de gravedad en pacientes sépticos.

7.3. Déficit de linfocitos T y anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en pacientes sépticos

En un estudio previo, realizado en el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, se definieron los valores de referencia normales en sujetos sanos para $LT\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, así como para cada uno de sus subtipos (Andreu-Ballester *et al.*, 2012). En la Tabla 125 quedan descritos los rangos de referencia para linfocitos B y T.

Tabla 125. Valores e intervalos de referencia normales para cada uno de los subtipos de células T/mm³.

| Subtipos de células T | Media | Mediana | D.E. | Intervalo de Referencia |
|---|---------|---------|-------|-------------------------|
| CD3+ | 1.487,3 | 1.482,0 | 447,3 | 720,5 – 3.070,1 |
| CD3+CD4+ | 927,0 | 927,2 | 519,6 | 408,2 – 2.105,2 |
| CD3+CD8+ | 583,8 | 580,0 | 586,8 | 236,2 – 1.443,2 |
| CD3+CD56+ | 223,1 | 232,1 | 158,8 | 49,3 – 1.008,5 |
| CD3+ $\alpha\beta$ | 1.363,6 | 1.336,2 | 457,4 | 651,7 – 2.853,5 |
| CD3+CD4+ $\alpha\beta$ | 880,3 | 904,6 | 545,2 | 375,1 – 2.065,8 |
| CD3+CD8+ $\alpha\beta$ | 432,8 | 455,1 | 797,1 | 137,2 – 1.365,7 |
| CD3+CD56+ $\alpha\beta$ | 44,6 | 50,0 | 262,8 | 4,3 – 453,0 |
| CD3+ $\gamma\delta$ | 45,6 | 45,2 | 603,2 | 7,0 – 297,8 |
| CD3+CD4 ⁺ CD8 ⁻ $\gamma\delta$ | 31,7 | 35,0 | 769,8 | 4,3 – 234,0 |
| CD3+CD8+ $\gamma\delta$ | 11,2 | 10,6 | 899,0 | 1,3 – 90,6 |
| CD3+CD56+ $\gamma\delta$ | 5,4 | 6,4 | 59,1 | 0,3 – 85,1 |
| CD19+ | 181,3 | 206,2 | 7,1 | 46,2 – 710,5 |

De acuerdo a estos valores se analizaron los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* y se relacionaron con el déficit de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en pacientes sépticos (Tabla 126).

Al analizar las variaciones en los niveles de anticuerpos IgS anti-*A. simplex*, se observó un descenso estadísticamente significativo para las poblaciones CD3+CD8+ y CD3+CD56+ $\gamma\delta$. Por el contrario, para la población CD3+CD4+ $\alpha\beta$ este hecho solo se dio respecto a los niveles de IgM anti-*A. simplex*.

Los anticuerpos IgA anti-*A. simplex* mostraron los niveles más bajos en el grupo de pacientes con déficit de $\alpha\beta$ (CD4+y CD8+), así como para todas las poblaciones de células T $\gamma\delta$. Estas diferencias significativas fueron más acusadas en el caso de las poblaciones CD3+CD8+ $\gamma\delta$ + y CD3+CD56+ $\gamma\delta$ +

No se encontraron diferencias para los niveles de IgG e IgE anti-*A. simplex*. La deficiencia en células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ se muestra en la Figura 167.

Tabla 126. Diferencias entre los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en relación a la presencia de déficit o no de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ T en todos los pacientes sépticos.

| | | IgS Total | | IgG | | IgM | | IgE | | IgA | |
|--|---------|-----------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Subpoblacion es de células T Déficit N (%) | Déficit | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. | Media | D.E. |
| CD3+ $\alpha\beta$ 83 (72.8) | No | 0,351 | 0,202 | 0,741 | 0,281 | 0,567 | 0,257 | 0,017 | 0,033 | 0,352 | 0,252 |
| | SÍ | 0,332 | 0,205 | 0,762 | 0,317 | 0,550 | 0,306 | 0,009 | 0,014 | 0,305 | 0,272 |
| CD3+CD4+ $\alpha\beta$ 74 (64.9) | No | 0,377 | 0,219 | 0,737 | 0,284 | *0,620 | 0,28 | 0,016 | 0,030 | *0,37 | 0,272 |
| | SÍ | 0,315 | 0,192 | 0,767 | 0,319 | *0,520 | 0,295 | 0,009 | 0,014 | *0,28 | 0,260 |
| CD3+CD8+ $\alpha\beta$ 60 (52.6) | No | 0,365 | 0,208 | 0,813 | 0,310 | 0,568 | 0,289 | 0,015 | 0,028 | *0,36 | 0,290 |
| | SÍ | 0,312 | 0,197 | 0,706 | 0,297 | 0,543 | 0,298 | 0,008 | 0,010 | *0,27 | 0,237 |
| CD3+CD56+ $\alpha\beta$ | No | 0,318 | 0,186 | 0,758 | 0,301 | 0,548 | 0,286 | 0,012 | 0,023 | 0,294 | 0,230 |
| | SÍ | 0,404 | 0,248 | 0,752 | 0,332 | 0,580 | 0,321 | 0,009 | 0,010 | 0,404 | 0,363 |
| CD3+ $\gamma\delta$ 48 (42.1) | No | 0,347 | 0,208 | 0,749 | 0,313 | 0,549 | 0,296 | 0,014 | 0,026 | *0,32 | 0,227 |
| | SÍ | 0,323 | 0,199 | 0,767 | 0,300 | 0,563 | 0,292 | 0,008 | 0,009 | *0,30 | 0,315 |
| CD3+CD4- CD8- $\gamma\delta$ | NO | 0,342 | 0,202 | 0,749 | 0,304 | 0,540 | 0,295 | 0,016 | 0,028 | *0,33 | 0,222 |
| | SÍ | 0,332 | 0,206 | 0,764 | 0,311 | 0,569 | 0,292 | 0,008 | 0,009 | *0,30 | 0,305 |
| CD3+CD8+ $\gamma\delta$ 42 (36.8) | No | •0,368 | 0,208 | 0,771 | 0,318 | 0,583 | 0,314 | 0,012 | 0,018 | •0,34 | 0,240 |
| | SÍ | •0,283 | 0,185 | 0,731 | 0,287 | 0,506 | 0,247 | 0,012 | 0,025 | •0,27 | 0,305 |
| CD3+CD56+ $\gamma\delta$ | No | •0,351 | 0,233 | 0,768 | 0,282 | 0,565 | 0,304 | 0,016 | 0,024 | •0,38 | 0,254 |
| | SÍ | •0,332 | 0,193 | 0,753 | 0,316 | 0,551 | 0,290 | 0,010 | 0,020 | •0,29 | 0,268 |

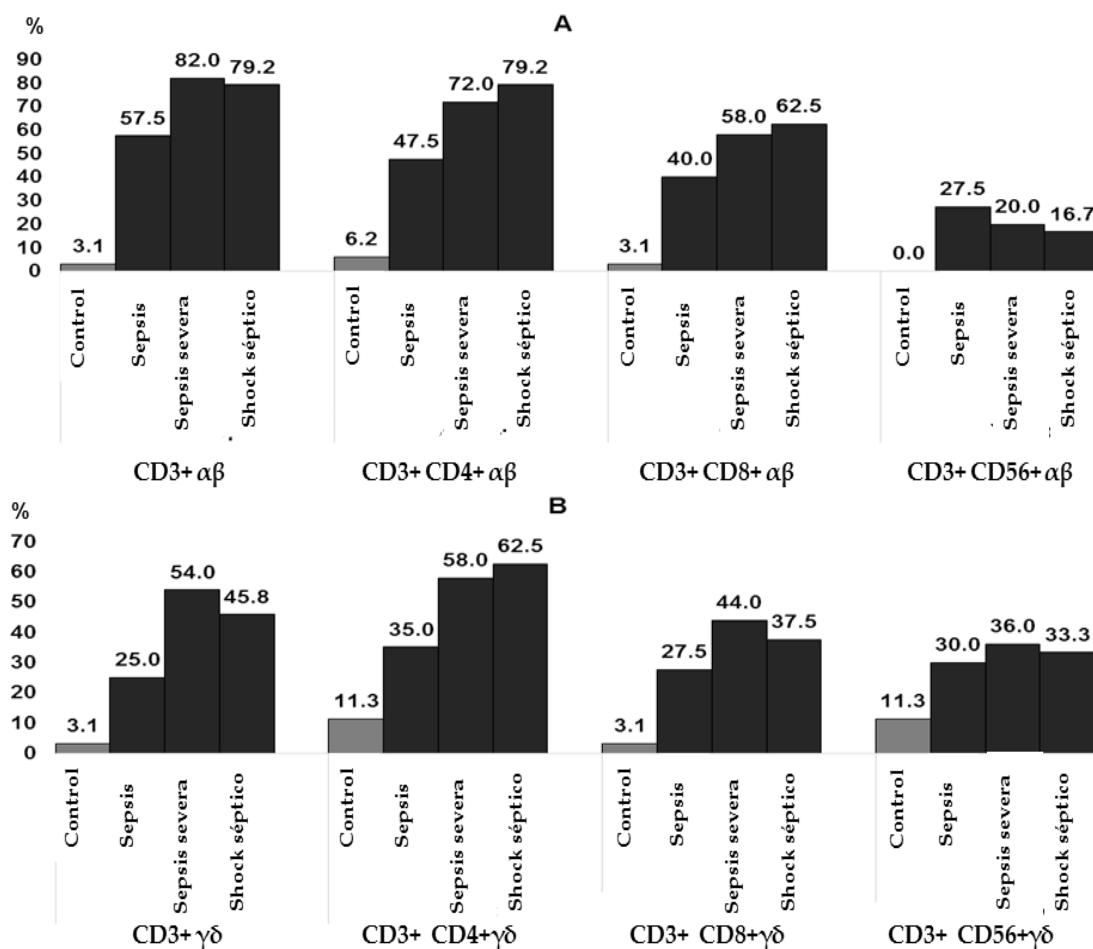


Figura 167. Muestra la deficiencia en células T $\alpha\beta$ (A) y $\gamma\delta$ (B), de acuerdo con la severidad del cuadro séptico (%). Control (N=97), Sepsis (N=40), Sepsis Severa (N=50), Shock Séptico (N=24). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y total de todos los pacientes sépticos ($p < 0.001$), así como entre el grupo de sepsis no complicada y sepsis severa/shock séptico ($p < 0.05$), con la excepción de las células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ CD3+CD56+.

7.4. Relación entre los días de evolución del cuadro séptico con los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* y los linfocitos T

La relación entre los niveles de linfocitos T $\gamma\delta$ de sangre periférica y el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección/sepsis hasta la admisión en la Unidad de Cuidados Intensivos/Urgencias se muestran en la Figura 168 A.

Al estudiar los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* en relación a los días de evolución de la sepsis, se detectó un descenso significativo en los niveles de IgA anti-*A. simplex* a partir del tercer día desde el inicio del cuadro séptico ($p=0,003$). Este descenso además se correlacionó con el descenso de los niveles de células T $\gamma\delta$ (Figura 168 B).

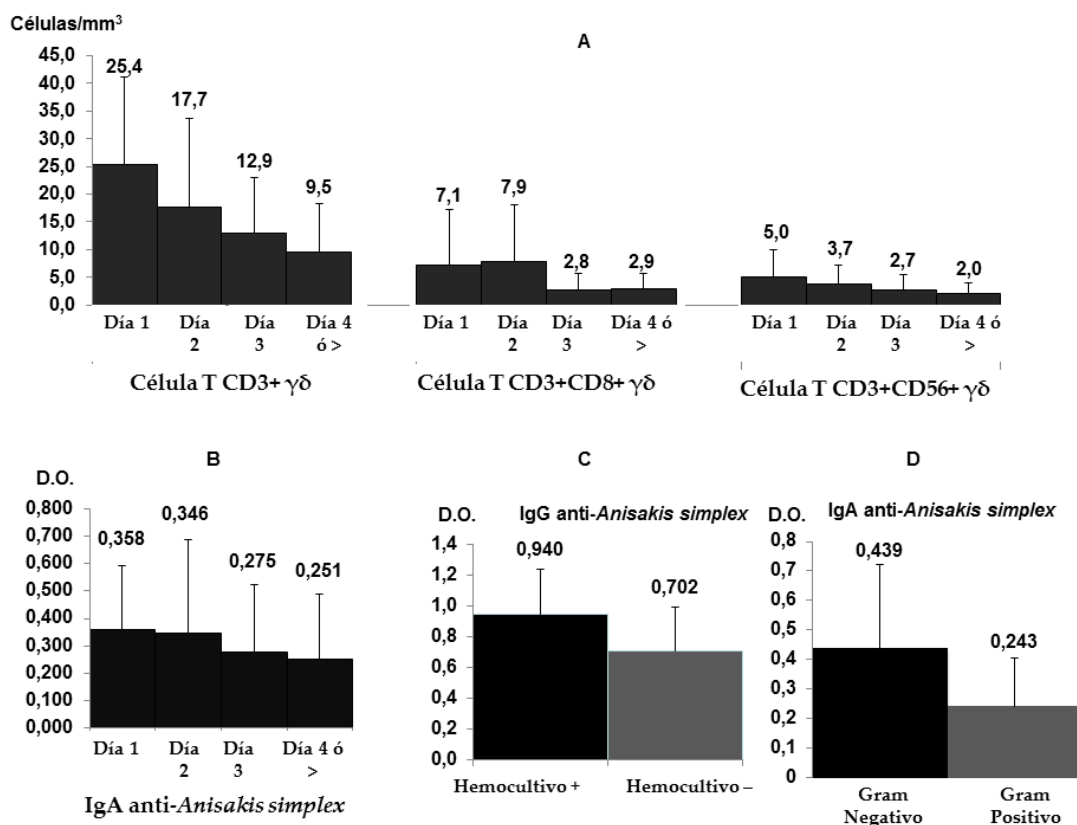


Figura 168. Panel A: LT $\gamma\delta$ de sangre periférica en relación con el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección/sepsis y su admisión en el servicio de Urgencias/Unidad de Cuidados Intensivos (todos los pacientes sépticos). Los valores están expresados a modo de media (células/mm³), y la T sobre cada barra indica el intervalo de confianza del 95%. El número de pacientes por grupo fue el siguiente: 1 día, n=43; 2 días, n=27; 3 días, n=16; y tres o cuatro días, n=28. Para células CD3+ T $\gamma\delta$, se encontraron diferencias significativas entre los días 1-3 ($p=0,050$), 1-4 (0,008); Para células CD3+CD8+ T $\gamma\delta$, entre los días 1-2 y 3 ($p=0,035$), 1-2 y 4 (0,042); Para células CD3+CD56+, se determinaron diferencias significativas entre los días 1 y 4 ($p=0,045$). Panel B: Niveles de Ig A anti-*Anisakis simplex* en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de la infección/sepsis y la admisión en el servicio de Urgencias/Unidad de Cuidados Intensivos. Diferencias entre el día 1-2 y 4 ($p=0,003$). Panel C: Niveles de IgG anti-A. simplex respecto a los hemocultivos ($p< 0,001$). Panel D: Niveles de IgA anti-A. simplex en relación a la tinción Gram ($p=0,016$). Los valores de los niveles de las inmunoglobulinas están expresados a modo de medias (D.O.) y el intervalo de confianza fue 95%. Valor P: Test U de Mann-Whitney.

7.5. Relación entre los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* y los cultivos positivos de fluidos biológicos

Cuarenta y ocho de los 114 pacientes con sepsis (42,1%) presentaron cultivos positivos. Los niveles de IgG anti-A. *simplex* fueron significativamente superiores en el grupo con hemocultivos positivos ($N = 26$) en comparación con el grupo con hemocultivos negativos ($0,940 \pm 0,295$ vs $0,702 \pm 0,289$, $p< 0,001$) (Figura 168 C). No se encontraron diferencias en el caso de otros cultivos positivos (orinas, exudados, etc). Tampoco para los niveles de anticuerpos anti-A. *simplex* IgM, IgE e IgA cuando se compararon con los hemocultivos positivos y negativos.

Tras estudiar los microorganismos aislados mediante tinción de Gram, se observaron niveles de IgM e IgA en suero superiores en el caso de bacterias Gram negativas (GN) en comparación a los encontrados para bacterias Gram positivas (GP). En esta línea, los valores medios para IgM anti-*A. simplex* en GN fueron $0,627 \pm 0,301$ vs $0,465 \pm 0,317$ en GP, $p=0,210$; y los valores medios de IgA anti-*A. simplex* en GN fueron $0,439 \pm 0,283$ vs $0,243 \pm 0,163$ en GP, $p=0,01644$ (Figura 168 D)

7.6. Relación entre el descenso en los niveles de los distintos subtipos de células T y la mortalidad por sepsis

La mortalidad por sepsis en los pacientes incluidos en este estudio fue del 16,6% (19/114).

En la Tabla 127 se describe la relación entre el descenso en los niveles de los distintos subtipos de células T y la mortalidad por sepsis. El descenso en los niveles de los LT $\gamma\delta$ y, principalmente para la población CD56+ $\gamma\delta$, estuvieron claramente relacionados con la mortalidad.

Tabla 127. Relación entre la mortalidad y el déficit de en los subtipos de linfocitos T

| Linfocitos T | Muerte/ Déficit | Muerte/No. Déficit | OR (95%CI) | Valor P |
|--|-----------------|--------------------|---------------------|---------|
| CD3+ $\alpha\beta$ | 16/83 (19,3) | 3/31 (9,7) | 2,23 (0,60 – 8,26) | 0,271 |
| CD3+CD4+ $\alpha\beta$ | 16/74 (21,6) | 3/40 (7,5) | 3,40 (0,93 – 12,49) | 0,067 |
| CD3+CD8+ $\alpha\beta$ | 12/60 (20,0) | 7/54 (13,0) | 1,68 (0,61 – 4,63) | 0,451 |
| CD3+CD56+ $\alpha\beta$ | 4/25 (16,0) | 15/89 (16,9) | 0,94 (0,28 – 3,14) | 1,000 |
| CD3+ $\gamma\delta$ | 12/48 (25,0) | 7/66 (10,6) | 2,81 (1,02 – 7,79) | 0,038 |
| CD3+CD4 ⁻ CD8 ⁻ $\gamma\delta$ | 14/58 (24,1) | 5/56 (8,9) | 3,25 (1,08 – 9,73) | 0,043 |
| CD3+CD8+ $\gamma\delta$ | 10/42 (23,8) | 9/72 (12,5) | 2,19 (0,81 – 5,92) | 0,128 |
| CD3+CD56+ $\gamma\delta$ | 18/84 (21,4) | 1/30 (3,3) | 7,91 (1,01 – 62,08) | 0,023 |

Así, los pacientes que presentaron un déficit de células T CD56+ $\gamma\delta$ a lo largo de la evolución del cuadro séptico, presentaron una probabilidad de morir ocho veces superior a los pacientes que no presentaron dicho déficit.

En el caso de los niveles de anticuerpos específicos anti-*A. simplex* no se encontraron diferencias significativas en relación a la mortalidad por sepsis. Sin embargo, los niveles de IgS anti-*A. simplex* fueron inferiores en el grupo de pacientes que murieron ($0,270 \pm 0,151$) en comparación con el grupo de pacientes que sobrevivió ($0,350 \pm 0,210$) ($p=0,061$). Esto mismo se observó en el caso concreto de los niveles de IgE anti-*A. simplex*, los cuales fueron inferiores para el grupo de los pacientes que murieron ($0,007 \pm 0,006$) vs supervivientes ($0,012 \pm 0,022$) ($p=0,077$).

VII. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Efecto de los productos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la maduración y diferenciación de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón CD11c+

Tal y como se explicó en el capítulo de la Introducción, una vez en el sistema gastrointestinal, la larva de *A. simplex* comenzará a penetrar la mucosa, liberando sus productos de excreción-secreción (ES). Estos entrarán en contacto con las células de la zona, principalmente CDs, y darán lugar a una respuesta inmunitaria predominantemente Th2, que resultará en la producción de IgE y expulsión del parásito (Baird *et al.* 2014). El parasitismo por *A. simplex*, agudo e intermitente por excelencia, origina una respuesta Th2 propia de los helmintos. Sin embargo, carece de los mecanismos reguladores suficientes para establecerse de forma crónica en su hospedador accidental (el ser humano), de tal manera que predomina un fenotipo alérgico (Anisakiosis gastro-alérgica/AGA y urticaria crónica asociada a sensibilización a *Anisakis*/UC+) (Daschner y Cuéllar, 2010). Esto encaja con la Hipótesis de la Higiene, la cual defiende que los mecanismos reguladores que inhiben las respuestas alérgicas están relacionados con las infecciones crónicas por helmintos (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002).

A pesar de que la respuesta inmunitaria humoral frente a *A. simplex* se ha caracterizado tanto en animales (Perteguer y Cuéllar, 1998 y 2001; Cuéllar *et al.*, 1997; Baeza *et al.* 2005) como en humanos (Daschner *et al.*, 2002, 2012, 2014), a día de hoy apenas existen referencias sobre cómo los productos larvarios de *A. simplex* interactúan con la inmunidad celular. Además, está el hecho de que el parasitismo por *A. simplex* no siempre es sintomático, y no siempre da lugar a cuadros alérgicos (Kasuya *et al.*, 1990). Esto, unido a su capacidad para regular el sistema inmunitario tal y como se demuestra en algunos estudios comentados en los apartados correspondientes del capítulo de la Introducción, sugiere que los antígenos larvarios de *A. simplex* podrían presentar capacidad inmunorreguladora. Una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales este parásito interfiere en el sistema inmunitario de su hospedador permitiría no solo conocer los factores desencadenantes de la inflamación y cuadros alérgicos, sino también aquellos capaces de inmunorregular e inhibir la respuesta Th2 frente a este parásito. Esto, a su vez, aportaría nuevos datos sobre las alergias y el conocimiento de cómo combatirlas.

Si bien las referencias sobre el efecto de los antígenos de otros helmintos sobre las CDs son abundantes, apenas se han descrito en *A. simplex*. Con todo, podemos destacar el aumento de IL-10 a través de la activación del receptor TLR2 y la disminución de la inflamación intestinal en un modelo *in vivo* de colitis inducida en ratones, empleando la proteína recombinante rAs-MIF (Macrophage migration inhibitory factor de *A. simplex*) (Cho *et al.*, 2011), la cual deriva de As-MIF, aislada de los productos larvarios de excreción-secreción de *A. simplex* (Park *et al.*, 2009).

La evaluación del nivel de maduración y activación de las CDs viene determinada por sus marcadores de maduración y activación más importantes, que son el aumento en la expresión de MHC II, CD80, CD86 y CD40 en su superficie. Así, niveles de expresión elevados de las moléculas anteriormente mencionadas, determinarán una maduración completa de las CDs. Además, las CDs activadas producirán citocinas y quimioquinas proinflamatorias como la IL-12, IL-6, IL-23 y TNF- α (Kapsenberg, 2003). Esto permitirá a las CDs interactuar y comunicarse con otras células y dirigir el curso de la respuesta inmunitaria. La IL-12 dará lugar a la expansión de las poblaciones de linfocitos T efectores, al reclutamiento de macrófagos al lugar de la infección y activará la producción de citocinas proinflamatorias por otras células inmunitarias, como IFN- γ y TNF- α , originando una respuesta tipo Th1 (White y Artanavis Tsakonas, 2012).

Por el contrario, en el contexto de las infecciones por helmintos, las CDs expuestas desarrollan un fenotipo muy diferente. De forma general, presentan un fenotipo “semi-maduro”, con baja expresión o ausencia casi total de estos marcadores en su superficie, y la producción de citocinas proinflamatorias aparece reducida. Todo ello conduce al desarrollo de respuestas de tipo Th2 por la inmunidad adaptativa (MacDonald y Maizels, 2008). Posteriormente, esta respuesta efectora tipo Th2 puede generar CDs tolerogénicas, creándose un balance entre los linfocitos efectores Th2 y los T_{reg} (Everts *et al.*, 2010).

En el caso de *A. simplex*, son escasos los datos sobre cómo los antígenos larvarios afectan a la maduración y activación de las CDs. Por ello, en esta investigación se estudiaron, *in vitro*, en BMDDCs obtenidas de ratones BALB/c y CD57BL/6, los efectos de los productos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, sobre la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, así como de las moléculas MHC I y MHC II en células CD11c+.

Se comprobó que, a día 6 de diferenciación y tras 24 h de estimulación, para ambas cepas de ratón, tanto ES como CE ocasionaron un incremento discreto respecto al control sin estimular, de todas las moléculas de superficie analizadas. En el caso de CE, el aumento en la población CD11c+ CD80+ fue cercano a la significancia ($p=0,05$), así como la expresión de CD86 se incrementó significativamente ($p=0,047$), en ratones BALB/c. Además, en los ratones C57BL/6, ES amplió significativamente la población CD11c+ CD80+ ($p=0,028$) y redujo la expresión de CD11c ($p=0,039$) respecto al control. Aun así, el incremento causado por ES y CE fue considerablemente inferior al producido por los controles positivos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) respecto al control negativo.

Por otro lado, a día 9 de maduración y tras las 24 h de estimulación, ES o CE aumentaron de nuevo las poblaciones CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+, así como las células CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ respecto al control negativo en los ratones BALB/c. Sin embargo, este incremento solo fue estadísticamente significativo para las células CD11c+ CD86+ en presencia de ES ($p=0,006$) y cercano a la significancia para la expresión de CD86 bajo el efecto de CE ($p=0,05$). En los ratones C57BL/6 se encontró significancia en el descenso en la expresión de CD11c ejercido tanto por ES como CE

respecto al control ($p=0,008$, $p=0,032$). A pesar de ello, la activación ocasionada por ES y CE continuó siendo inferior a la causada por LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) respecto al control sin estimular.

Por consiguiente, se comprueba que, tanto a día 6 como a día 9, los antígenos larvarios de *A. simplex* dieron lugar a CDs con un fenotipo “semimaduro”, característico de la respuesta a helmintos tipo Th2, con baja expresión de los marcadores de activación de superficie. Estudios similares realizados con los antígenos de *excreción-secreción* de *T. spiralis*, presentaron resultados acordes a los nuestros, con BMDDCs que no alcanzaron una maduración completa (Ilic *et al.*, 2008 y 2011). También la estimulación de BMDDCs de ratón con los productos ES de *Nippostrongylus brasiliensis*, originaron CDs inmaduras con aumento en la expresión de CD86 y Ox40L, pero ningún efecto sobre MHC I, así como inducción en las citocinas IL-10 e IL-12 (Balic *et al.*, 2004). En nuestro estudio, de forma general y en ambas cepas de ratón, la producción de citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF- α creció ligeramente en comparación con el control sin estimular, aunque en ningún caso de forma significativa. Sobre todo en el caso de la IL-12 y, en especial, como consecuencia de la estimulación con CE. Por su parte, TNF- α , apenas se vio aumentado en la cepa de ratón BALB/c, mientras sí que se incrementó en los ratones C57BL/6, tanto por ES como por CE. No obstante, el incremento producido por ES y CE de las citocinas proinflamatorias fue, en la mayoría de los casos, muy inferior al ocasionado por LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) en solitario respecto al control sin estimular.

En cuanto a la expresión intracelular de la IL-10, se determinó que, tras 12 y 24 h de estimulación, esta expresión aumentó moderadamente respecto al control, principalmente bajo el estímulo de ES y, en menor medida, de CE, en ambas cepas de ratón. Mientras que tanto LPS *E. coli* 026B6 como CpG (ODN1826) en solitario la disminuyeron respecto al control, y solo la aumentaron a día 6 de diferenciación tras 24 h de estimulación.

Por otro lado, tras 48 h de estimulación, la cantidad de IL-10 hallada en los sobrenadantes de las BMDDCs fue inferior en los ratones BALB/c, pero superior en los C57BL/6 a la del control sin estimular bajo el efecto de ES o CE. Además, LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826) ocasionaron niveles extracelulares de IL-10 superiores frente a los detectados en las BMDDCs sin estimular, o bajo el efecto de ES o CE en ambas cepas.

En conjunto, en todos los tiempos analizados, se ha demostrado que la producción de IL-10 fue superior en las cepas de ratón C57BL/6 en comparación con las de los ratones BALB/c, que presentaron niveles de IL-12 superiores. No solo eso, sino que, tras 48 h de estimulación con ES o CE, la cantidad de IL-10 extracelular fue inferior a la del control en los ratones BALB/c. Lo indicado sugiere que, ante una primo-infección, la cepa BALB/c resultaría más susceptible a los productos larvarios de *A. simplex*, mientras que en los ratones C57BL/6 se desarrollaría una respuesta más discreta y resistente. Esto coincide con resultados de trabajos previos, realizados en modelos experimentales murinos de anisakiosis, en los que se observaron estas respuestas diferentes según las cepas utilizadas (Perteguer y Cuéllar, 1998). Por su parte, tras 12 h de estimulación, la

producción de TNF- α inducida por ES y CE fue levemente superior en los ratones C57BL/6 respecto a los BALB/c.

Por último, cabe resaltar que la expresión de todas las moléculas de superficie estudiadas, así como la expresión intracelular de IL-10 y IL-12, no se vio modificada significativamente entre las células recogidas en día 6 o en día 9. Aunque sí fue, en general, levemente mayor en células de día 9, lo que probablemente se deba a una mayor maduración de las CDs en el momento de la estimulación, que las permitiría actuar más rápidamente.

Por tanto, los productos larvarios de *A. simplex* incrementaron levemente, *in vitro*, tanto las citocinas proinflamatorias propias de la respuesta efectora Th1, como las citocinas supresoras características de la respuesta efectora Th2. Varios estudios han demostrado que la expresión de IL-10 e IL-12 está estrechamente relacionada. De tal manera que la producción de IL-10 e IL-12 por las CDs presenta una estrecha regulación recíproca (Xia y Kao, 2003; Muthana *et al.*, 2006). Así, la IL-10 es uno de los principales reguladores negativos de la IL-12 (Ma *et al.*, 2015). Esto indica un posible mecanismo inmunomodulador por parte de los antígenos larvarios de *A. simplex*, a través de estas dos citocinas, estableciéndose un balance entre la respuesta Th1 y la respuesta Th2. La infección por otros parásitos ha demostrado este mismo equilibrio, como es el caso de *T. spiralis* (Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2015) o *Schistosoma* sp. (Xu *et al.*, 2014a; Xu *et al.*, 2016).

Todo esto sugiere que, tanto ES como CE, dieron lugar a CDs inmaduras. Como ya se dijo anteriormente, estas CDs inmaduras actúan como CDs tolerogénicas por su habilidad para delimitar la inflamación y regular el sistema inmunitario a través de una serie de mecanismos como son: moderar la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie, incrementar la producción de citocinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β), disminuir la producción de mediadores proinflamatorios (IL-12, TNF- α) y fomentar la expansión de T_{reg} (Steinman *et al.*, 2003).

Además, al mismo tiempo que ES y CE inducen CDs inmaduras productoras de IL-10, también promueven CDs de cierto carácter inflamatorio sintetizadoras de citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α). Hablando de manera muy simplificada, estarían coexistiendo dos respuestas de carácter opuesto: Th1 *versus* Th2. Esta homeostasis requiere de los factores de base del hospedador así como de las características propias del helminto: en el primero encaminadas a la eliminación del parásito así como limitar el daño patológico por parte de la respuesta inmune, y en el segundo, en establecerse y sobrevivir para continuar su ciclo biológico. El predominio de una de las dos respuestas, Th1 o Th2, determinará el desarrollo de una patología inflamatoria con daño tisular (Th1/Th17), la expulsión o eliminación del parásito (Th2) o bien una infección crónica asintomática (T_{reg}/Th2) (Figura 169) (Nutman, 2015).

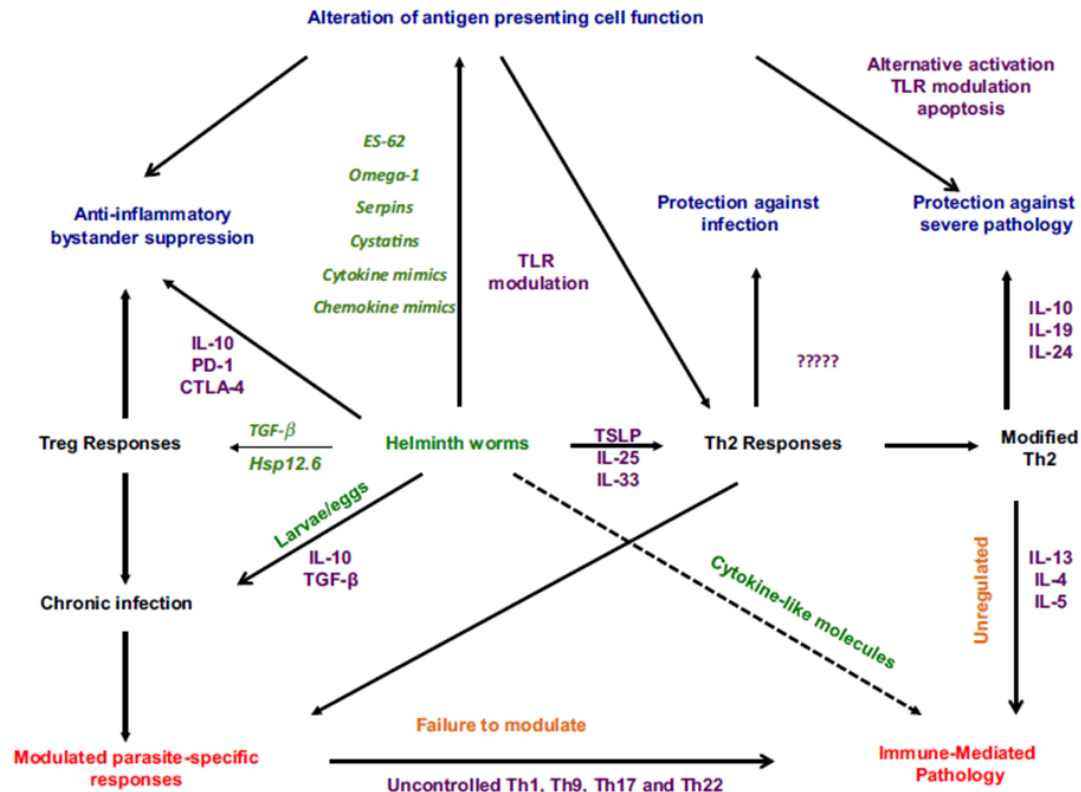


Figura 169. Esquema en el que se relaciona la respuesta inmunitaria del hospedador frente al helminto parásito. Se señalan en azul los mecanismos característicos inducidos por el hospedador (morado), o por el helminto (verde), que dan lugar a un cuadro específico (rojo). (Nutman, 2015).

Tal y como se ha venido diciendo, el parasitismo por *A. simplex* (anisakiosis), debido en parte a la ausencia de una co-evolución parásito-hospedador, origina una respuesta aguda y específica de tipo Th2, que resulta en la expulsión de la larva, dado que no dispone de los mecanismos reguladores característicos de otros helmintos para establecer una infección crónica. Esto explicaría, en parte, los resultados obtenidos en BMDDCs de ratón *in vitro*. Si bien los productos larvarios de *A. simplex* indujeron CD de fenotipo inmaduro, también provocaron el aumento en la expresión de IL-12, mientras que apenas incrementaron la IL-10 respecto al control.

Se observaron resultados similares en BMDDCs estimuladas con ABF (*pseudocoelomic body fluid*) de *A. lumbricoides*. No solo eso, sino que al inyectar dichas CD en ratones vírgenes, una nueva restimulación resultó en el incremento significativo de los niveles de IL-4, IL-10 e IL-5 respecto a las CD sin estimular (Dowling *et al.*, 2010). Por tanto, dos aspectos esenciales en la regulación de las CD son la inhibición en la expresión de las moléculas coestimuladoras así como los bajos niveles de citocinas proinflamatorias, que llevará a la inducción de una respuesta tipo Th2 (Carvalho *et al.*, 2009).

Sin embargo, se considera que es necesario profundizar más en los mecanismos mediante los cuales los productos larvarios de *A. simplex* son capaces de interferir en la

respuesta inmunitaria del hospedador. Ya que se ha demostrado que los TLR son esenciales en los mecanismos de defensa desarrollados frente a bacterias y virus, es bastante probable que también jueguen un papel en las respuestas innata y adaptativa frente a las infecciones por helmintos. Los productos de excreción-secreción, glicoproteínas y microARNs de helmintos son capaces de activar la respuesta inmunitaria a través de los TLR (Aranzamendi *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2014a; Cho *et al.* 2010).

A. simplex, en particular, libera al medio sus productos de excreción-secreción durante la parasitación del aparato digestivo, mientras que el hospedador no entra en contacto con sus antígenos somáticos hasta que la larva es destruida por el granuloma en la parasitación crónica. Algunos ejemplos son *Anisakis* ASP1, ASP2 y Ani s 6, los cuales pertenecen a una clase única de inhibidores de nematodos (*smapins/small serine protease inhibitors*), o el alérgeno Ani s 1 (Morris *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2007). Así mismo, son pocos los trabajos que han descrito la posible interacción de los productos larvarios con las CDs y linfocitos. Cho *et al.* (2011, 2015) describieron la mejora de colitis inducida experimentalmente, así como de la respuesta alérgica en vías respiratorias en un modelo murino *in vivo* por acción de As-MIF a través de TLR2.

Por este motivo se quiso determinar el efecto producido por los antígenos larvarios de *A. simplex* sobre la estimulación ejercida por los agonistas de los TLR ensayados. En resumen, de acuerdo con los resultados obtenidos, ES y CE son capaces de modificar de forma significativa la respuesta desencadenada principalmente por los agonistas de TLR2, 3, 4 y 9, para ambas cepas estudiadas. Además, en la cepa BALB/c los productos larvarios de *A. simplex* modificaron significativamente el efecto producido por los agonistas de los TLR5, 6 y 7 (Figuras 170 y 171).

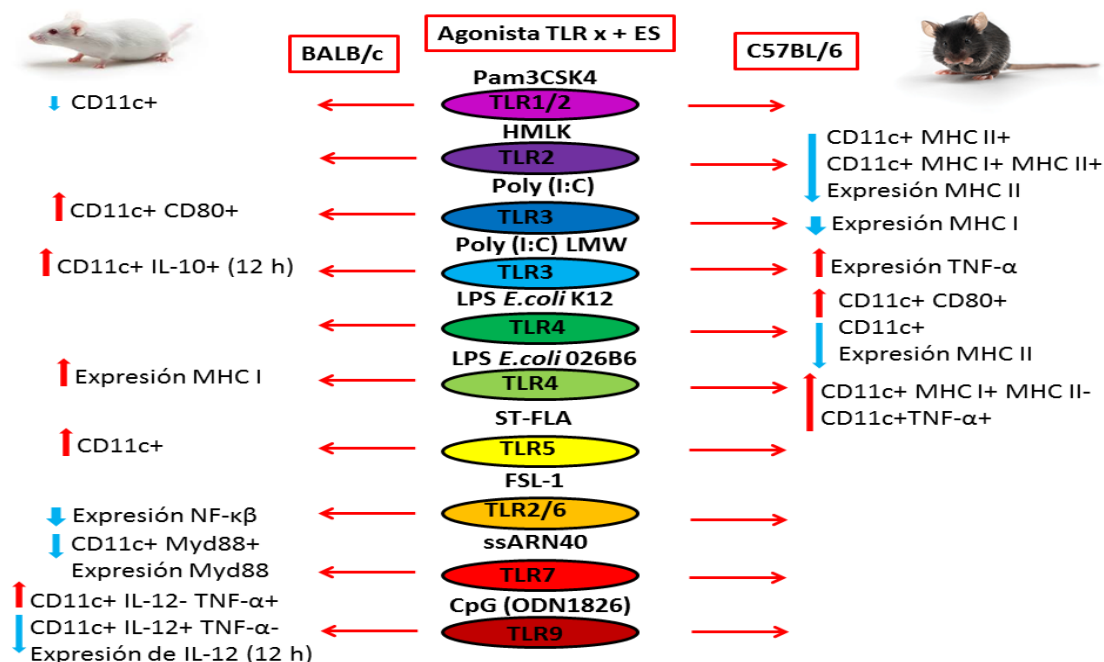


Figura 170. Modificación significativa del efecto de los agonistas de los TLR ensayados por ES de *Anisakis simplex* en BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6.

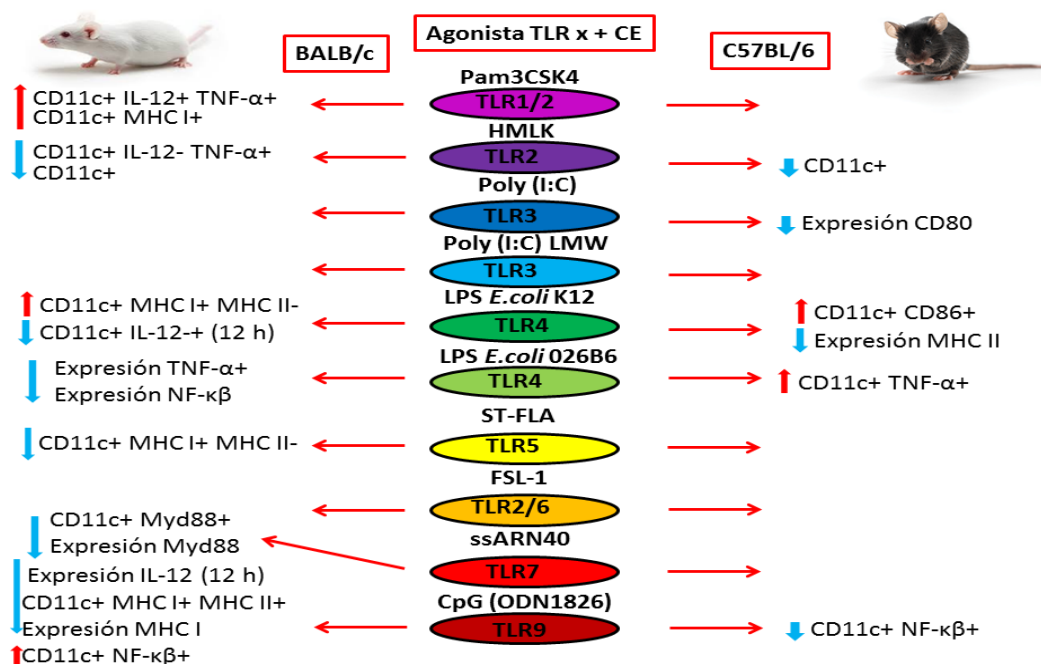


Figura 171. Modificación significativa del efecto de los agonistas de los TLR ensayados por CE de *Anisakis simplex* en BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6.

Estos resultados sugieren que los TLR podrían estar estrechamente relacionados con la infección por *A. simplex*, como se ha descrito para otros helmintos como *S. mansoni* (TLR2, TLR3), *Fasciola hepatica* (TLR3), *Acanthocheilonema viteae* (TLR4), *Taenia crassiceps* (TLR4, TLR9) (Daniłowicz-Luebert *et al.*, 2011) y *T. spiralis* (TLR4, TLR9) (Kim *et al.*, 2015). Sin embargo, al no disponer de datos más exhaustivos, sería más acertado decir que los TLR podrían estar implicados en el reconocimiento de los productos larvarios de *A. simplex* o bien, que estos estén actuando en algún punto de la vía de activación de los TLR de las CDs, activándola o inhibiéndola.

En primer lugar, en los ratones BALB/c la asociación tanto de ES como de CE con el agonista de TLR1/2 (Pam3CSK4), incrementó la población CD11c+ IL-12+ TNF-α+ (12h) respecto al agonista en solitario, y para el caso de CE lo hizo significativamente ($p=0,006$). Además, la coestimulación simultánea con ES y Pam3CSK4 simultáneamente redujo significativamente el número de células CD11c+ respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,038$), mientras que la combinación con CE favoreció una mayor expresión de MHC I en células CD11c+ ($p=0,024$). Por el contrario, ni ES ni CE ocasionaron cambios estadísticamente significativos en las cepas C57BL/6 al asociarse con Pam3CSK4.

La potenciación de las CDs productoras de citocinas proinflamatorias, junto con el incremento en la expresión de MHC I, podría estar indicando un posible sinergismo entre los productos larvarios de *A. simplex* y Pam3CSK4, al menos en los ratones BALB/c. Además, ES y CE disminuyeron los niveles de IL-10 al asociarse con Pam3CSK4 en sobrenadantes tras 48 h de estimulación. Se ha descrito que la lisofosfatidilserina de *Schistosoma* podría estar mediando la activación de las CDs a través de TLR2 (van der Kleij *et al.*, 2002), así como se ha visto que el agonista PamCys

comparte esta habilidad para mantener la fosforilación de ERK en CDs. Todo esto sugiere que la mediación de los antígenos de algunos helmintos sobre las CDs podría estar mediada por TLR2 (Agrawal *et al.*, 2003). En cuanto a los ratones C57BL/6, no parece que los productos larvarios de *A. simplex* establecieran algún tipo de interacción con Pam3CSK4, lo cual podría estar relacionado con la menor susceptibilidad de esta cepa al parásito.

En segundo lugar, los efectos producidos por ES y CE al combinarse con HMLK fueron variados. En los ratones BALB/c, la coestimulación con CE disminuyó de forma significativa la expresión de la molécula de superficie CD11c ($p=0,041$), así como redujo la población CD11c+ IL-12- TNF- α + respecto a HMLK en solitario ($p=0,013$). Por el contrario, aunque ES no causó cambios estadísticamente significativos, se apreció un aumento en la población CD11c+ IL-12- TNF- α + respecto a HKLM en solitario. Así mismo, los niveles de IL10 tras 48 h de estimulación disminuyeron significativamente ($p=0,0001$) al asociar ES o CE con HKLM.

Por otra parte, en los ratones C57BL/6 la asociación de ES con HMLK, redujo de forma significativa las poblaciones, CD11c+ MHC II+ y CD11c+ MHC I+ MHC II+, así como la expresión de MHC II respecto a este agonista en solitario ($p=0,036$, $p=0,014$, $p=0,045$, respectivamente). La asociación con CE incrementó en cambio la expresión de MHC II en las células CD11c+, aunque no fue estadísticamente significativo. Tanto ES como CE redujeron la proporción de células CD11c+ respecto a HMLK solo, siendo dicha reducción estadísticamente significativa para CE ($p=0,001$). Los niveles de IL-10 tras 48 h de estimulación incrementaron discretamente al asociar HKLM con ES o CE.

En resumen, teniendo en cuenta que HMLK se caracteriza por inducir una fuerte respuesta de tipo Th1 (Flo *et al.*, 2000; Hauf *et al.*, 1997), en los ratones BALB/c, CE inhibió la respuesta proinflamatoria desencadenada por HMLK, reduciendo las células que produjeron TNF- α tras 12 h de estimulación; así mismo, ES y CE redujeron los niveles de IL-10 originados por HKLM tras 48 h. Esto sugiere que, al comienzo de la estimulación, ES y CE podrían antagonizar la acción inflamatoria de HKLM, pero con el paso del tiempo la balanza se estaría inclinando de nuevo a favor de una respuesta de tipo Th1.

Por su parte, en los ratones C57BL/6, ES interfirió en la expresión de MHC II, disminuyéndola y, por tanto, bloqueando en parte la capacidad presentadora de antígenos que es responsable de la activación de las CDs. Además, tanto en los ratones BALB/c como C57BL/6, ES y CE redujeron la proporción de células CD11c. Todo ello sugiere que los productos larvarios de *A. simplex* presentaron capacidad para inhibir, hasta cierto punto, la producción de citocinas proinflamatorias en los ratones BALB/c, y dificultar con ello la maduración y activación de las células CD11c+ en los C57BL/6 desencadenada por el agonista HMLK.

En cuanto a la coestimulación con Poly (I:C), se observa que la respuesta inflamatoria ocasionada por este agonista se vio modificada de forma discreta por ES o CE, tanto en los ratones BALB/c como C57BL/6. En los ratones BALB/c, ES aumentó de forma

significativa las células CD11c⁺ CD80⁺ respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,019$), y por el contrario en los ratones C57BL/6 redujo la expresión de MHC I ($p=0,045$) (CE también disminuyó la expresión de MHC I, aunque no significativamente). De este modo, no parece que los antígenos larvarios de *A. simplex* inhibieran o potenciaron en gran medida la propia actividad estimuladora de Poly (I:C) en ninguna de las cepas de ratón estudiada. Si bien, tras 48 h de estimulación, ES redujo significativamente los niveles de IL-10 respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,0001$), mientras que CE presentó el efecto contrario ($p=0,0001$).

En contraste, la asociación de ES y CE con Poly (I:C) LMW, en los ratones BALB/c aumentó la población CD11c⁺ IL-10⁺ (12 h) respecto al agonista en solitario, siendo estadísticamente significativo para ES ($p=0,022$). Por el contrario, en los ratones C57BL/6, tanto ES como CE incrementaron la expresión de TNF- α en células CD11c⁺ respecto a Poly (I:C) LMW solo, siendo estadísticamente significativo en el caso de ES ($p=0,034$). Además, CE disminuyó de forma significativa la expresión de CD80 respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,019$). De esta forma, los efectos producidos por los productos larvarios de *A. simplex* sobre la estimulación causada por Poly (I:C) LMW en las dos cepas de ratón estudiadas fueron contrapuestos: en el caso de los BALB/c, aumentaron la IL-10 inhibiendo la respuesta inflamatoria, mientras que en los C57BL/6 aumentaron el TNF- α , agravándola.

Tanto Poly (I:C) como Poly (I:C) LMW son agonistas de TLR3, pero presentan distintos mecanismos de acción (Martins *et al.*, 2014). El hecho de que los productos larvarios de *A. simplex* solo dieran lugar a cambios en la respuesta generada por el segundo, podría estar indicando que ES y CE no son capaces de generar una respuesta de forma directa sobre el receptor TLR3, pero sí de interferir en algún punto de la respuesta desencadenada por este. En cambio, se ha descrito la implicación de TLR3, en la respuesta frente a los huevos de *Schistosoma*. Contienen ARN de doble hebra capaz de activar la señalización por NF- κ B en CDs e inducir la producción de IFN- β (Vanhoutte *et al.*, 2007).

Así mismo, se determinó el efecto de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la estimulación producida por dos agonistas de TLR4: LPS *E. coli* K12 y LPS *E. coli* 026B6. De forma general, para ambas cepas de ratón, tanto ES como CE incrementaron la expresión de MHC I, así como la población CD11c⁺ MHC I producida por ambos tipos de LPS en solitario. Igualmente, la asociación de ES con ambos LPS incrementó en ambas cepas de ratón, los niveles de IL-10 producidos por los dos LPS solos tras 48 h de estimulación, mientras que CE la disminuyó. Aun así, los efectos producidos por ES y CE sobre los dos LPS ensayados, presentaron algunas diferencias que serán comentadas a continuación.

En primer lugar, en ratones BALB/c, la asociación de CE con LPS *E. coli* K12 aumentó significativamente la población CD11c⁺ MHC I+ MHC II- ($p=0,014$) y redujo las células CD11c⁺ IL-12⁺ (12 h) ($p=0,026$) (ES también disminuyó esta última población, pero sin diferencias estadísticamente significativas). Por su parte, en los ratones C57BL/6, la asociación de ES con LPS *E. coli* K12 redujo de manera significativa las células CD11c⁺

totales ($p=0,002$). Además, tanto ES como CE disminuyeron significativamente la expresión de MHC II tanto en las CD11c+ MHC II+ ($p=0,046$, $p=0,0037$, respectivamente) totales como en la población de células CD11c+ MHC I+ MHC II+ ($p=0,034$, $p=0,024$, respectivamente) ocasionada por LPS *E. coli* K12 en solitario. Por otra parte, ES potenció el aumento en la población CD11c+ CD80+ producido por LPS *E. coli* K12 ($p=0,043$), mientras que CE inhibió el incremento de las células CD11c+ CD86+ provocado por LPS *E. coli* K12 ($p=0,013$).

En cuanto a la coestimulación de ES o CE con el otro LPS ensayado, LPS *E. coli* 026B6, en los ratones BALB/c la asociación con ES potenció la expresión de MHC I ocasionada por el ligando en solitario, tanto en la población CD11c+ MHC I+ MHC II+ ($p=0,03$) así como en las CD11c+ MHC I+ MHC II- ($p=0,03$). CE también aumentó la expresión de MHC I en la última población citada, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Además, CE inhibió la expresión de TNF- α ($p=0,045$) y NF- κ B ($p=0,036$) causada por LPS *E. coli* 026B6 solo individualmente. En los ratones C57BL/6, la combinación de ES o CE con LPS *E. coli* 026B6 favoreció también el aumento de la población CD11c+ MHC I+ MHC II- respecto al agonista solo, siendo significativo ese aumento en el caso de ES ($p=0,032$). En cambio, tanto ES como CE fomentaron significativamente las células CD11c+ TNF- α + respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,021$).

Estos resultados sugieren que la fuerte respuesta inflamatoria de tipo Th1 ejercida por LPS *E. coli* K12 y LPS *E. coli* 026B6, con incremento de todas las moléculas de superficie (salvo en el caso de MHC II, que disminuyó) así como de las citocinas proinflamatorias estudiadas, fue, hasta cierto punto, inhibida por ES y CE en los ratones BALB/c. Pues, a pesar de que ES o CE redujeron significativamente IL-12 o TNF- α , así como NF- κ B, también incrementaron la presentación antigénica por la vía MHC I. Se ha demostrado la capacidad de transformación de los linfocitos T CD8+ a CD4+ dependientes de MHC I sin perder su especificidad antigénica. Esto facilita el encuentro entre el linfocito T CD4+ con su antígeno específico unido a MHC I al no tener restricción por MHC II. Además, se ha visto que en esta plasticidad está implicada la microbiota intestinal, y que estos linfocitos T CD4+ pueden dar lugar a T_{reg} con expresión de Foxp3 (Guzmán *et al.*, 2015; Lui *et al.*, 2016). Por tanto, el incremento en la expresión de MHC I podría interpretarse como una inhibición de la respuesta Th1 y aumento de los linfocitos T CD4+ reguladores restringidos a MHC I.

La supresión de los efectos desencadenados por LPS de *E. coli* también se han descrito con los productos de excreción-secreción de *T. spiralis* en células HEK transfectadas con TLR4 de ratón (Aranzamendi *et al.*, 2012), así como en BMDDCs estimuladas con los productos de excreción-secreción de *N. brasiliensis* asociados a LPS (Balic *et al.*, 2004). *In vivo*, se ha descrito que la proteína aislada de *A. suum*, PAS-1, fue capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos tras el tratamiento con LPS (Oshiro *et al.*, 2005).

Por el contrario, en la cepa C57BL/6, tanto ES como CE potenciaron la respuesta inflamatoria causada con LPS *E. coli* K12 y LPS *E. coli* 026B6, disminuyendo la expresión de MHC II y aumentando MHC I, así como potenciando la producción de TNF- α . Esto

resultados son acordes con los obtenidos en estudios recientes realizados *in vivo* con ratones infectados con *N. brasiliensis* (infección corta, aguda) o *H. polygyrus* (infección crónica), en los que midieron la expresión de moléculas coestimuladoras así como citocinas en CDs de los nódulos mesentéricos del intestino delgado. Así, en estos estudios se determinó que la presencia de ambos parásitos, redujo la expresión de CD40 y CD86, así como la producción de IL-12 en respuesta a LPS se vio disminuida, mientras que se incrementaron TNF- α e IL-10 (Balic *et al.*, 2009).

Ahora bien, el hecho de que en nuestra investigación la respuesta tipo Th1 inducida por LPS se viera inhibida por ES y CE en los ratones BALB/c, y potenciada en los C57BL/6, puede explicarse también con los niveles de IL-10 alcanzados en ambas cepas tras 48 h de estimulación. De nuevo, los niveles de esta citocina supresora fueron mucho mayores en los ratones C57BL/6 que en los BALB/c, tanto bajo la estimulación con LPS solo como asociado a ES o CE, o bien de estos últimos en solitario. A este respecto, cabe indicar que Pils *et al.* (2010) demostraron que para la regulación de la respuesta inmunitaria innata desarrollada frente a LPS es crucial la regulación autocrina por parte de los macrófagos/monocitos a través de la IL-10. Así, cuanto mayor sean las señales inflamatorias, la expresión de IL-10 se verá incrementada con el objetivo de evitar la exacerbación de dicha señal. Por tanto, es lógico que en los ratones C57BL/6, donde ES y CE favorecieron la respuesta Th1 de LPS, se produjeran niveles mucho mayores de IL-10 que en los ratones BALB/c, en los que ES y CE se contrapusieron a la respuesta de LPS.

Por otro lado, el agonista de TLR5 empleado fue ST-FLA. Se ha descrito que ST-FLA induce la activación de NF- κ B y la síntesis de citocinas proinflamatorias así como de óxido nítrico (Hayasi *et al.*, 2001; Mizel *et al.*, 2003). Sin embargo, ni ES ni CE modificaron en gran medida la respuesta desencadenada por este agonista en ambas cepas de ratón. Tan solo se observó, en los BALB/c, que ES aumentó significativamente las CD11c⁺ respecto a ST-FLA individualmente ($p=0,007$), y que CE inhibió las células CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁻ ($p=0,029$). También, tras 48 horas de estimulación, CE incrementó significativamente los niveles de IL-10 al asociarse con ST-FLA en los ratones BALB/c ($p=0,0001$).

Posteriormente, se han determinado los efectos causados por ES y CE sobre la estimulación provocada por CpG (ODN1826), comprobándose que en los ratones BALB/c, tanto ES como CE potenciaron la producción de TNF- α desencadenada por el agonista de TLR9, ES de forma significativa (CD11c⁺ IL-12⁻ TNF- α ⁺, $p=0,049$). Por el contrario, ES y CE inhibieron significativamente la expresión de IL-12 ($p=0,028$, $p=0,004$, respectivamente) y, además, ES redujo la población CD11c⁺ IL-12⁺ TNF- α ⁻ ($p=0,028$) respecto a CpG (ODN1826) solo. CE redujo significativamente las células CD11c⁺ MHC I⁺ MHC II⁺ ($p=0,035$) y la expresión de MHC I ($p=0,024$).

Por tanto, los productos larvarios de *A. simplex* demostraron una capacidad insuficiente a la hora de bloquear la respuesta inflamatoria causada por CpG (ODN1826), pues a pesar de reducir la expresión de IL-12 así como la expresión de las MHC I y II, potenciaron la expresión de TNF- α y aumentaron las células CD11c⁺ NF-

$\kappa\beta+$ en ratones BALB/c. Además, la asociación con ES o CE disminuyó los niveles de IL-10 en sobrenadantes tras 48 h de estimulación. Por su parte, en los ratones C57BL/6 ni ES ni CE modificaron la respuesta inflamatoria desencadenada por CpG (ODN1826). Tan solo se apreció un descenso significativo en las células CD11c+ NF- $\kappa\beta+$ al asociar CE con CpG (ODN1826) ($p=0,033$), lo cual podría ser acorde con el incremento en la producción de IL-10 tras 48 h de estimulación con ES o CE asociados a CpG (ODN1826).

La combinación de ES o CE con FSL-1, que únicamente fue determinado en ratones BALB/c, redujo la expresión de NF- $\kappa\beta$ en células CD11c+ producida por el agonista de TLR2/6 FSL-1, siendo esta reducción significativa en el caso de ES ($p=0,025$). A pesar de que no se encontraron otros cambios estadísticamente significativos, el descenso en la expresión de NF- $\kappa\beta$ sugiere que ES y CE podrían presentar capacidad antiinflamatoria, al disminuir la actividad de la vía de señalización de este factor de transcripción. A este respecto, existen referencias que demuestran que las CDs expuestas a los antígenos de helmintos experimentan la activación de esta vía de señalización celular. Un ejemplo es LNFPIII (Lacto-N-fucopentosa III), que se encuentra en SEA (*soluble eggs antigens*) de *Schistosoma* (Artis *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005). Sin embargo, el papel que ocupa NF- $\kappa\beta$ en la inducción de la respuesta Th2 está aún hoy por determinar. Así mismo, las vías de señalización que llevan a la expresión y regulación de la IL-10 aún no están claras (Iyer y Cheng, 2012).

Tras 48 h de estimulación, los niveles de IL-10 en los sobrenadantes se vieron significativamente disminuidos frente a los hallados en las CDs estimuladas con FSL-1 en solitario. Son varias las moléculas que se han implicado en la regulación de la IL-10 (STAT, IRF, NF- $\kappa\beta$) (Zhang *et al.*, 2006), sin embargo, el papel de NF- $\kappa\beta$ es controvertido. Los primeros estudios que se realizaron en monocitos/macrófagos humanos, demostraron que la sobreexpresión de I κ B α , el cual inhibe la translocación de NF- κ B al núcleo, tuvo poco efecto sobre la expresión de IL-10 dependiente de los TLR, mientras que este hecho disminuyó citocinas proinflamatorias como TNF α (Bondeson *et al.*, 1999). Por otro lado, otros estudios señalaron la posibilidad de que NF- $\kappa\beta$ podría ser responsable de la regulación de la IL-10 al comienzo de su propia activación (Saraiva *et al.*, 2005). De este modo, no queda claro si el descenso en la expresión de NF- $\kappa\beta$ podría estar indicando la inhibición en la producción de IL-10, o bien, el descenso de IL-10 fue debido a otro mecanismo desconocido.

Por último, la asociación de ES o CE con ssARN 40, inhibió significativamente la expresión de Myd88 ($p=0,05$, $p=0,004$, respectivamente) así como la población de células CD11c+ Myd88+ respecto a ssARN 40 solo ($p=0,049$, $p=0,02$, respectivamente). Además, ES y CE disminuyeron las células CD11c+ MHC I+, aunque este descenso no fue estadísticamente significativo. Al igual que en el caso anterior, esto podría indicar que los productos larvarios de *A. simplex* son capaces de reducir Myd88 interactuando directamente con TLR7 o bien interfiriendo en algún punto de la señalización intracelular desencadenada por este receptor. Se sabe que los agonistas de los TLR, mediante el reclutamiento de Myd88, activan cascadas intracelulares que resultan en

una mayor expresión de MHC II (señal 1) y, de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 (señal 2), así como la producción de IL-12 (señal 3), originando así la respuesta Th1. En el caso de la respuesta Th2, las señales 2 y 3 no están claras. De hecho, la falta de moléculas coestimuladoras y de IL-12 ha dado lugar a la “Hipótesis por defecto” (MacDonald *et al.*, 2008). En resumen, los antígenos de los helmintos son capaces de modular la maduración de las CDs de diferentes maneras: bien activándolas (incrementando MHC II y las moléculas coestimuladoras) o bien inhibiendo su maduración (“Hipótesis por defecto”). En ambos casos, los helmintos desencadenan una respuesta Th2 (Jankovic *et al.*, 2006; Maizels *et al.*, 2004). Por tanto, aun cuando el incremento intracelular de Myd88 estaría indicando una mayor activación, no está claro su implicación en el desarrollo en la respuesta Th2 o Th1.

En conjunto, en esta investigación, los productos larvarios de *A. simplex* potenciaron de forma significativa la respuesta desencadenada por los agonistas de TLR1/2 (Pam3CSK4) e inhibieron la acción originada por los agonistas de TLR2, 3, 6/2 y 7 en los ratones BALB/c. En el caso concreto de los agonistas de TLR4 y TLR9 ensayados, los productos larvarios de *A. simplex* presentaron un efecto dual (inhibición/potenciación) sobre la respuesta ocasionada por este agonista. En cuanto a los C57BL/6, ES y CE favorecieron los agonistas de TLR3 [Poly (I:C) LMW] y TLR4 (LPS), mientras que solo se vio inhibida la respuesta originada por parte de Poly (I:C) LMW. No hubo cambios para el agonista TLR5 en ninguna de las dos cepas. Aranzamendi *et al.* (2004), investigaron el efecto de los distintos agonistas de los TLR en presencia y ausencia de los antígenos ES de la larva 1 muscular de *T. spiralis* sobre CDs, y demostraron que no hubo cambios ni en la expresión de los marcadores de maduración superficiales ni en la producción de citocinas, excepto en el caso del agonista de TLR4 (LPS *E. coli*), en el que ES de la L1 inhibió la respuesta desencadenada por dicho agonista. Así, concluyeron que la inmunomodulación producida por las larvas musculares de este parásito estaba mediada por TLR4. También, Kim *et al.* (2015), determinaron la variación en la expresión génica de los distintos TLR durante la infección por *T. spiralis* en ratones. Concluyeron que, dado que la expresión de TLR4 y TLR9 se vio incrementada durante la fase intestinal de la infección (que se corresponde con una respuesta Th2), estos dos TLR podrían estar implicados en el desarrollo de la respuesta Th2 para este helminto. Por último, estudios *in vivo* han demostrado la supresión de la respuesta inflamatoria en un modelo de colitis y otro de asma en ratones por As-MIF de *A. simplex* a través de TLR2 (Cho *et al.*, 2010, 2011).

Así, los productos larvarios de *A. simplex* podrían estar ejerciendo su acción reguladora, a través de su interacción con los TLR, principalmente TLR2 y con la excepción de TLR5. Esto saca a relucir una falta de mecanismos específicos por parte de *A. simplex* hacia el sistema inmunitario del hospedador, que en este caso, sería el ratón, siempre recordando que todos los experimentos se realizaron *in vitro*.

De este modo, la modificación de la respuesta ejercida por parte de la mayoría de los agonistas de los TLR podría estar relacionada con el hecho de que los productos larvarios de *A. simplex* son capaces de inducir una respuesta principalmente Th2, pero

también Th1. Esta falta de especificidad podría explicarse por el hecho de que el ratón, al igual que el ser humano, no es el hospedador de este parásito y, por tanto, *A. simplex*, no está adecuadamente adaptado a él. Quizás este sea el motivo por el cual, a pesar de que se han identificado varios mecanismos mediante los cuales es capaz de regular la respuesta inmunitaria del hospedador a su favor, estos no resultan suficientes y la larva L3 del parásito no es capaz de permanecer de forma crónica en el ser humano.

Aun así, debido al carácter preliminar del trabajo y la falta de estudios similares con *A. simplex* con los que poder comparar nuestros resultados, sería necesario un análisis más exhaustivo para determinar si esta interacción se está produciendo de forma directa por los antígenos ES y CE sobre los TLR, o bien a nivel de la cascada de activación o expresión génica. Además, son necesarios estudios *in vivo* para confirmar que estos resultados son extrapolables al modelo de infección.

2. Efectos de los productos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la diferenciación de esplenocitos en presencia de CDs previamente estimuladas con ES y CE

La activación de las CDs se puede evaluar, no solo por la expresión de marcadores de superficie de maduración y la producción de ciertas citocinas, sino también por su capacidad para presentar antígenos a los linfocitos T e inducir su activación y diferenciación. Aun cuando bajo la acción de los antígenos larvarios de *A. simplex*, ES y CE, las CDs ensayadas *in vitro* no alcanzaron un fenotipo de maduración y activación completo, sí tenían la capacidad para presentar antígenos a los linfocitos T y dirigir su polarización.

Al cocultivar esplenocitos de ratones sanos junto con CDs previamente estimuladas con los antígenos larvarios de *A. simplex*, se produjo la expansión de linfocitos T reguladores en comparación con el control negativo.

En primer lugar, en los ratones BALB/c se pudo apreciar la expansión de las poblaciones de linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ y CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ bajo la acción de CDs previamente estimuladas con ES o CE, respecto al control negativo. Estas células, además, produjeron IL-10, lo que confirmó su fenotipo regulador. Además, la estimulación previa de CDs tanto con ES como con CE dio lugar a un descenso en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ totales en comparación con el control negativo, el cual fue significativo para los CD4⁺ y ES ($p=0,0273$). La falta de CDs maduras y activadas se ha descrito en *H. polygyrus* en condiciones experimentales similares. Estas CDs indujeron linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ productores de IL-10 *in vitro*, que a su vez inhibieron la producción de IFN- γ y proliferación celular. Los autores sugirieron que mediante la amplificación de esta población, los ES de este parásito serían capaces de inhibir tanto la respuesta Th1 como Th2 (Segura *et al.*, 2007). Se hace notar que tanto *A. simplex* como *H. polygyrus* son parásitos intestinales. La inducción de la diferenciación de T_{reg} por las CDs intestinales expuestas a helmintos, constituye un mecanismo que permite la inmunomodulación del sistema inmunitario (Smits *et al.*, 2005; Segura *et al.*, 2007), dado que se ha visto que los T_{reg} están implicados tanto en las

respuestas alérgicas (Th2) como en enfermedades autoinmunes (Th1) (Else *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en ratones BALB/c, por tanto, podrían sugerir un nuevo mecanismo regulador del sistema inmunitario, por parte de los antígenos larvarios de *A. simplex*, que hasta ahora era desconocido: la generación de T_{reg} a partir de CDs inmaduras.

Por otro lado, en los ratones C57BL/6, las dos poblaciones linfocitarias que más se vieron modificadas fueron los CD4⁺ CD25⁻ y CD8⁺ CD25⁻. Más concretamente, las poblaciones CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ y CD8⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ se vieron incrementadas por CE, mientras que ES la redujo respecto al control negativo. Si bien en ningún caso estos cambios fueron estadísticamente significativos, sí lo fue la inhibición de la población CD8⁺ CD25⁺ y la potenciación de los linfocitos CD8⁺ CD25⁻ por CE respecto al control negativo ($p=0,0112$ en ambos casos). Por tanto, al igual que en los ratones BALB/c, las CDs tolerogénicas producidas por los productos larvarios de *A. simplex*, originaron la expansión de T_{reg} . La principal diferencia radicó en que en los ratones C57BL/6, la producción de IL-10 fue muy similar a la del control, y la población favorecida fue la de los linfocitos CD25⁻ (en los BALB/c, fue CD25⁺).

Por último, tanto en los ratones BALB/c como C57BL/6, la expresión de la citocina proinflamatoria IFN- γ se vio incrementada respecto a las CDs sin estimular. Las poblaciones de linfocitos en las que dicho incremento fue mayor en comparación con el control fueron, en los ratones BALB/c, CD4⁺ CD25⁺ IFN- γ ⁺ y CD4⁺ CD25⁻ IFN- γ ⁺, y en los ratones C57BL/6, CD4⁺ CD25⁻ IFN- γ ⁺ y CD8⁺ CD25⁻ IFN- γ ⁺. Este hecho, contrasta el estudio anteriormente mencionado con el helminto *H. polygyrus*, en el que la población de células CD4⁺ CD25⁺ no expresó IFN- γ (Segura *et al.*, 2007). Mientras que, experimentos *in vivo* realizados en ratones con PAS-1 de *A. suum*, originaron linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ que modularon la inflamación alérgica de vías aéreas en ratón mediante la expresión de IL-10 e IFN- γ (Araujo *et al.*, 2008 y 2010). De nuevo, sale a relucir la dualidad en la respuesta inmunitaria desencadenada por los antígenos larvarios de *A. simplex*. No es casualidad que *A. suum* y *A. simplex*, nematodos que pertenecen al mismo orden filogenético (*Ascaridida*) y en los que se han descrito respuestas de tipo alérgico en sus hospedadores (Cooper, 2009), presenten en común esta capacidad para generar poblaciones de T_{reg} y, al mismo tiempo, promover la expresión de IFN- γ . Clásicamente, el IFN- γ es una citocina característica de la respuesta Th1 responsable de la activación de macrófagos y células NK, frente a patógenos intracelulares (Garrido-Mesa *et al.*, 2013). No obstante, son cada vez mayores los estudios que le dotan de actividad reguladora del sistema inmunitario y, asimismo, que puede estar implicado en las respuestas alérgicas (Gaudieri *et al.*, 2012). A este respecto, Chen y Liu (2009) demostraron la capacidad inmunorreguladora de la población de linfocitos CD4⁺ IL-10⁺ IFN- γ ⁺, además de que se ha descrito su implicación en infecciones crónicas. La IL-10 prevendría la respuesta exacerbada frente al hospedador, inhibiendo la IL-12 y la respuesta Th2 (inhibiendo las los linfocitos CD4⁺ efectores), mientras que el IFN- γ (además de acrecentar la respuesta Th1)

activaría la producción de IL-27 por las APCs, que a su vez activarían los linfocitos T CD4⁺ IL-10⁺ IFN- γ ⁺.

En conjunto, estos resultados sugieren que tanto los productos de excreción-secreción como el extracto total de *A. simplex* dan lugar a CDs tolerogénicas que podrían inducir la expansión de T_{reg} funcionales *in vitro*. Al mismo tiempo, como ya se ha visto anteriormente, estas CDs producen de forma moderada IL-12 y TNF- α que podrían ser los responsables de promover la población de linfocitos T productores de citocinas típicas de la respuesta Th1, como es el IFN- γ , como se puede observar en la Figura 173.

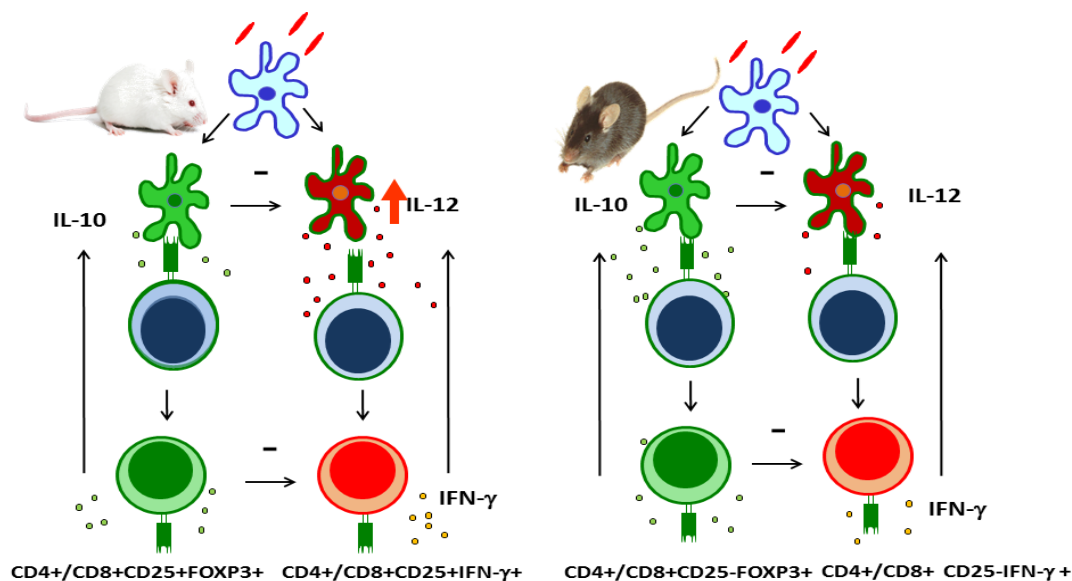


Figura 172. La estimulación de BMDDCs con los productos larvarios de *Anisakis simplex* origina, por un lado, CDs tolerogénicas productoras de IL-10 y, por otro, CDs de tipo Th1 productoras de IL-12 y/o TNF- α . En los ratones BALB/c, se estaría desarrollando una respuesta inflamatoria aguda con menor producción de IL-10 y mayor de IL-12 en comparación con la cepa C57BL/6. Así, las CDs tolerogénicas productoras de IL-10 inducirán linfocitos T reguladores productores de IL-10 que, a su vez, inhibirán a los linfocitos T productores de IFN- γ , inducidos por las CDs de carácter inflamatorio. De este modo los productos larvarios de *A. simplex* son capaces de inmunomodular la respuesta inmunitaria.

El desarrollo de estas dos respuestas, aparentemente opuestas, podría estar, por un lado, relacionada con los diferentes fenotipos de ambas cepas de ratón estudiadas, una más susceptible (BALB/c) y otra resistente (C57BL/6). Por otro lado, la síntesis de dos citocinas con funciones aparentemente contrarias, podrían ser consideradas como un mecanismo autorregulador conjunto: las poblaciones de linfocitos productores de IL-10 irían encaminados a reducir la respuesta Th1 y Th2 iniciales, mientras que las poblaciones productoras de IFN- γ promoverían la respuesta Th1 al mismo tiempo que ejercerían su función inmunomoduladora potenciando aún más la secreción de IL-10. Siempre y cuando existiera un equilibrio entre la producción de IL-10 e IFN- γ , las respuestas Th2 y Th1 se mantendrían a raya, y predominaría el fenotipo regulador.

3. Efecto de los productos larvarios de *Anisakis simplex* sobre la proliferación de esplenocitos de ratón

La respuesta inmunitaria desarrollada en ratones frente a la infección por *A. simplex* es compleja y conlleva el predominio de una respuesta Th2 sobre una Th1 iniciales (Perteguer y Cuéllar, 1998). En humanos, la respuesta desarrollada frente a la infección por este parásito es similar (Daschner *et al.*, 2002). Además, según los resultados recogidos en esta tesis, podría estar acompañada por la activación de CDs tolerogénicas capaces de inducir poblaciones de T_{reg} productoras de IL-10 e IFN- γ , encaminadas a inmunomodular estas respuestas Th2/Th1. Sin embargo, son pocas las referencias que han estudiado el efecto de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la linfoproliferación. Raybourne *et al.* (1983) describieron la inhibición de la linfoproliferación sobre la respuesta ejercida por Concanavalina A y LPS bacteriano por parte de los productos de excreción-secreción de *A. simplex*.

En nuestro caso, se determinó el efecto de los productos larvarios de *A. simplex* (ES y CE) a lo largo del tiempo (hasta 72 h) en solitario, así como sobre la respuesta desencadenada por los mitógenos LPS *E. coli* 026B6 y CpG (ODN1826), en la proliferación de esplenocitos de ratón vírgenes. A su vez, se compararon los efectos obtenidos en las dos cepas de ratón ensayadas, BALB/c y C57BL/6. Así, tanto ES como CE y en ambas cepas de ratón, estimularon la linfoproliferación respecto al control sin estimular. Conforme transcurrió el tiempo, se constató una mayor linfoproliferación respecto al control, en especial por parte de CE. El hecho de que CE, y no ES, origine un incremento superior de la proliferación podría estar relacionado con la formación del granuloma en el modelo de infección *in vivo*. Pues es en ese contexto en el que la larva muerta queda atrapada y es degradada, cuando el extracto crudo del parásito (CE) entra en contacto con el sistema inmunitario del hospedador. El granuloma es el resultado de un reclutamiento celular (eosinófilos, CDs, linfocitos) en respuesta a señales de carácter inflamatorio (Jones *et al.*, 1990). Por tanto, según esto ES podría estar más relacionado con el desarrollo de la respuesta Th2, mientras que CE estaría más implicado en la Th1.

Por otro lado, al asociar ES o CE tanto a LPS *E. coli* 026B6 como a CpG (ODN1826), de nuevo, se obtuvieron respuestas contrarias en ambas cepas de ratón. Así, mientras que en los ratones BALB/c tanto ES como CE potenciaron de forma significativa la linfoproliferación ocasionada por ambos mitógenos (muy superior a la del control negativo), en los ratones C57BL/6 se determinó el efecto contrario. De forma general, este efecto fue más marcado al inicio de la estimulación, pues a partir de las 48 h post-estimulación tendieron a igualarse a la acción de los mitógenos en solitario. Solo en el caso de los ratones BALB/c, la potenciación por parte de ES o CE sobre la respuesta originada por LPS *E. coli* 026B6, tuvo lugar de forma tardía (72 h).

El hecho de que los productos larvarios de *A. simplex* amplificaran en los ratones BALB/c, mientras que en los C57BL/6 inhibieran a los mitógenos, una vez más, deja patente las distintas respuestas enfrentadas en ambas cepas de ratón estudiadas. La IL-10 presenta múltiples funciones, y una de ellas es la de inhibir la proliferación celular

(Taga y Tosato, 1992). Por este motivo, no es de extrañar que la cepa C57BL/6 que presentó mayores niveles de IL-10 de forma generalizada, fuera precisamente la que fue capaz de inhibir la linfoproliferación producida por los dos mitógenos testados. Así, la respuesta inmune desarrollada frente a *A. simplex* no solo dependerá de los propios mecanismos inmunorreguladores del parásito, sino también del fenotipo de base del hospedador (Sánchez-Velasco *et al.*, 2000). Los BALB/c se corresponderían con los individuos de fenotipo resistente a las infecciones por helmintos, caracterizados por reacciones inflamatorias más agudas y marcadas de tipo Th2 (AGA, UC+) propias de regiones endémicas de helmintos, mientras que la cepa C57BL/6 representaría a aquellos individuos que desarrollarían respuestas más moderadas y una situación de anisakiosis intestinal crónica (Le Souëf *et al.*, 2000; Daschner y Cuéllar, 2010).

Se han descrito resultados similares en otros parásitos, como *H. polygyrus*. Este presenta una respuesta inmunitaria de tipo Th2, pero acompañada de la activación de células T_{reg} y la inhibición de citocinas tipo Th1 (Setiawan *et al.*, 2007; Maizels *et al.*, 2012). Reynolds *et al.*, (2012) describieron la reducción en la linfoproliferación ejercida por Concanavalina A, *in vivo*, en ratones infectados con dicho helminto. También es conocida la capacidad de *N. americanus* para inhibir la proliferación celular (Geiger *et al.*, 2004; Fujiwara *et al.*, 2006). Los mecanismos responsables de esta capacidad supresora de la proliferación de los linfocitos T no están de todo claros, aunque se ha relacionado con citocinas reguladoras como la IL-10 (Sánchez-Velasco *et al.*, 2000), la secreción de IFN- γ por las células NK (Teixeira-Carvalho *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2004) la acción directa de algunos antígenos de determinados parásitos (Geiger *et al.*, 2004) y la reducción en la expresión de los TLR (Hartgers *et al.*, 2008; Babu *et al.*, 2006). Igualmente, las últimas investigaciones han propuesto que la alteración en la presentación de antígenos en las CDs, podría estar también implicada en una disminución en la capacidad proliferativa de los linfocitos (León *et al.*, 2005).

Los productos larvarios de *A. simplex* presentaron resultados similares a los de otros helmintos, como *H. polygyrus* o *N. americanus*, en los cuales se ha reconocido su capacidad para inhibir la proliferación linfocitaria. Aun cuando los productos larvarios de *A. simplex* no siempre ocasionaron una inhibición de la linfoproliferación, y esta dependió de la cepa de ratón empleada, estos resultados señalan la existencia de ciertos mecanismos reguladores por parte de este parásito y confirman que la base genética del hospedador es primordial en el desarrollo de una respuesta Th2 o T_{reg}.

4. Anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en suero de individuos sanos: su relación con células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$

Este es el primer estudio realizado en el que se ha investigado la posible relación existente entre los niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* presentes en suero de individuos sanos y los niveles de LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

En primer lugar, cabe destacar que la población CD3+ $\gamma\delta$ fue significativamente inferior en los sujetos que presentaron niveles detectables de IgA anti-*A. simplex*. Este hecho fue especialmente llamativo para el subtipo de linfocitos CD3+CD8+ $\gamma\delta$. En relación con esto, Borrelli *et al.* (2010) observaron un incremento de los linfocitos intraepiteliales TCR- $\gamma\delta$ en pacientes con deficiencia de IgA, además de un ratio de TCR- $\gamma\delta$ /CD3+ superior al que presentaron los pacientes con niveles de IgA normales. Esto podría estar indicando la existencia de un mecanismo compensatorio ante la carencia de dichos anticuerpos (IgA), tan decisivos en la defensa inmunológica de las superficies mucosas. En nuestro estudio, en el caso de los anticuerpos IgA específicos anti-*A. simplex*, encontramos un incremento significativo en el ratio de CD56+ $\gamma\delta$ /CD3+ y CD8+ $\gamma\delta$ /CD3+ para el grupo de sujetos con niveles de IgA indetectables, frente a los sujetos que sí produjeron IgA.

De este modo, en aquellos pacientes sin deficiencia de IgA anti-*A. simplex*, esta podría estar actuando a nivel de la *lamina propria*, uniéndose a los antígenos de *A. simplex*, si se diera el caso de una nueva parasitación por la larva viva del parásito. No sería pues necesario un aumento de la densidad de población de los linfocitos intraepiteliales, lo cual sí ocurriría en los sujetos con deficiencia en la producción de IgA. También, se ha descrito la existencia de una relación estrecha entre el ARNm de la IL-6 y las células TCR- $\gamma\delta$ en ovejas inmunizadas a *Trichostrongylus colubriformis*, mientras que el incremento en la expresión del ARNm de IL-6 no presenta relación alguna con la inducción de IgA (Shen *et al.*, 2000).

Por otro lado, no existen en la actualidad referencias en las que se estudie la existencia de una relación entre la estimulación de los anticuerpos específicos anti-*A. simplex* y las células NKT. En este trabajo, los distintos isotipos de inmunoglobulinas estudiadas mediante ELISA, a excepción de la IgG, se correlacionaron negativamente con las células NKT, tanto $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$. Esto concuerda con un estudio previo, en el que se observó una correlación negativa entre los anticuerpos anti-*Encephalitozoon cuniculi* detectados y las poblaciones CD3+CD56+ $\alpha\beta$ T y CD3+CD56+ $\gamma\delta$ T, para IgE y, además, CD3+CD56+ $\alpha\beta$ T para IgG, en un grupo de sujetos sanos (Andreu-Ballester *et al.*, 2014).

Por otro lado, se sabe que las células NKT reconocen antígenos glicolipídicos presentados en la superficie celular por las moléculas CD1d (MHC I no clásicas). Esto es, podrían estar actuando como intermediarias entre la inmunidad innata y la adaptativa, mediando una respuesta inmunitaria más eficiente y rápida. Por ejemplo, iniciando la respuesta de células T frente a antígenos no peptídicos (Fujii *et al.*, 2013). Curiosamente, el receptor TCR de las células NKT reconoce los antígenos de forma similar a como lo hacen las células T $\gamma\delta$. Sin embargo, el papel en la expresión de dicho receptor $\gamma\delta$ en las células NKT es aún desconocido. Actualmente las células NKT mejor caracterizadas son las que expresan CD3 y presentan un único receptor TCR- $\alpha\beta$. Dicho de otro modo, es necesario profundizar en el papel que ocupan las células NKT $\gamma\delta$ en las respuestas inmunitarias frente a patógenos. De hecho, es probable que en la mayoría de estudios realizados hasta hoy sobre las células NKT, la población NKT $\gamma\delta$

esté incluida en ella, dado que casi ningún autor ha diferenciado entre ambas poblaciones (receptores T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$).

Nuestros resultados establecen una correlación inversamente proporcional entre las células NKT $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ y los anticuerpos específicos anti-*A. simplex*, lo cual orienta hacia el posible papel que las células NKT tienen en la inmunidad innata frente a este parásito. A su vez, esto estaría relacionado con la disminución de la población de células NKT en los sujetos con niveles detectables de anticuerpos específicos anti-*A. simplex*, en especial, el descenso de las células T $\gamma\delta$.

Así mismo, tanto el isotipo IgA como las células T $\gamma\delta$ son componentes esenciales de la defensa de las mucosas (Mantis *et al.*, 2011; Kabelitz *et al.*, 2005). En este estudio, las células CD3+CD56+ presentaron un descenso significativo en el grupo de sujetos positivos para anticuerpos anti-*A. simplex* (inmunoglobulinas totales e IgM). Respecto a esto, Green *et al.* (2007) observaron una correlación inversamente proporcional entre la frecuencia de las células NKT y los niveles de IgG e IgM en familiares de pacientes diagnosticados de lupus eritematoso sistémico. En conjunto, estos resultados sugieren un papel regulador de los niveles de anticuerpos por parte de las células NKT. Además, las células CD3+CD56+ $\alpha\beta$ presentaron una disminución significativa en el grupo de sujetos positivos en la producción de anticuerpos anti-*A. simplex*. Ahora bien, si tenemos en cuenta los resultados de Koyama (2002), las células NK1.1+ estarían involucradas en la protección frente a *T. muris* y no serían necesarias en las respuesta de tipo Th2 inducidas en las infecciones de la mayoría de parásitos. Aun así, los porcentajes de estas poblaciones iNKT en las mucosas son dependientes de la dieta y están directamente relacionados con el grado de atrofia de las superficies y mucosas (Calleja *et al.*, 2011). Por tanto, es esencial tener este hecho en cuenta a la hora de estudiar la respuesta inmunológica desarrollada frente a un parásito estrechamente relacionado con los hábitos alimenticios, como es el caso de *A. simplex*, cuya larva viva es capaz de penetrar la mucosa intestinal.

Finalmente, las células CD3+CD56+ $\gamma\delta$ presentaron una disminución significativa en el grupo de sujetos que presentaron niveles de anticuerpos anti-*A. simplex* detectables, especialmente en los sujetos IgA positivos. Aunque actualmente no se dispone de información que respalde esta población de células no convencional en las enfermedades asociadas a parásitos intestinales, su implicación en los mecanismos inmunológicos así como en la defensa frente a helmintos debería ser estudiada en profundidad. Resulta de interés que, dado que la IL-12 es capaz de inducir la activación de las células CD3+CD56+ $\gamma\delta$ periféricas de la sangre (Fujimiya *et al.*, 1997), los productos liberados por la larva viva en el grupo de sujetos sanos positivos podrían ejercer efectos inmunomoduladores, produciendo efectos opuestos y consecuentemente disminuyendo este subtipo celular.

En conclusión, las células NKT parecen estar implicadas en la respuesta inmunitaria desarrollada frente a *Anisakis*. Además, las células NKT presentan la capacidad de producir enormes cantidades de IL-4 en respuesta a antígenos de nematodos. Propiciando de esta manera el inicio de la respuesta Th2 característica y la producción de sus citocinas propias (Yoshimoto *et al.*, 1995). Puesto que la IL-4 está implicada en la

generación de respuestas alérgicas, el estudio de hasta qué punto las células NKT podrían estar relacionadas en este proceso (desarrollo de la respuesta Th2 y producción de IL-4) en respuesta a la activación fisiológica por infecciones de *Anisakis* resultaría de especial interés. Estudios previos sobre la capacidad de la L3 de *A. simplex* para producir respuestas con producción de anticuerpos demostraron que esta se puede producir con bastante rapidez (Perteguer y Cuéllar, 1998; Daschner *et al.*, 2002). Esto permitió proponer la hipótesis de que las células NKT podrían estar produciendo IL-4 durante la fase temprana de la infección por *Anisakis*, resultando en la inducción de altas cantidades adicionales de esta misma citocina y desencadenando una respuesta y diferenciación Th2 preliminar.

Por tanto, la investigación en este área debería continuar con el objetivo de mejorar nuestro conocimiento en este ámbito. De esta manera podríamos llegar a comprender mejor los mecanismos inmunológicos que se desarrollan frente a este parásito y poder encontrar tratamientos más eficaces de las enfermedades alérgicas.

5. Anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en suero de pacientes con sepsis

Si bien anteriormente se estudió la relación entre los niveles de inmunoglobulinas anti-*A. simplex* y los niveles de $LT\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ presentes en suero de individuos sanos, resultó de interés determinar esto mismo pero bajo condiciones patológicas, más concretamente en pacientes sépticos.

Estudios experimentales realizados en conejos (Hong y Lee, 1987; Yang *et al.*, 1991), mostraron que la IgG anti-*A. simplex* en suero alcanzaba sus niveles máximos a los 25-30 días tras la infección. A partir de este punto, desciende progresivamente hasta los 150 días (4 meses) postinfección. Recientemente, experimentos realizados mediante inoculación de ratones BALB/c, han demostrado la presencia de IgG anti-*Anisakis* en suero, frente a los antígenos somáticos y de excreción-secreción de *Anisakis* sp. (Vericimo *et al.*, 2014). En humanos, la respuesta humoral implica varios isotipos de anticuerpos anti-*A. simplex* frente a los antígenos de excreción-secreción, siendo los más fiables como indicadores de infección, IgA e IgE, en comparación con la IgG (Akao *et al.*, 1990). En contra, Rodero *et al.* (2006) realizaron la investigación de sueros procedentes de pacientes sensibilizados a *A. simplex* y observaron que la IgG fue la inmunoglobulina mayoritaria.

En el estudio actual, los niveles de IgG anti-*A. simplex* aumentaron con la severidad del cuadro séptico, alcanzando hasta el 30% de positividad en los pacientes en shock séptico. Esto podría estar indicando que, aquellos pacientes previamente inmunizados a dicho parásito, podrían desarrollar un cuadro séptico más grave. El aumento del anticuerpo IgG anti-*A. simplex* en los pacientes sépticos indicaría una infección primaria o una reinfección producida por nuevos contactos con el parásito tras ingestión de pescado parasitado, teniendo en cuenta el estado de inmunodeficiencia que se establece durante el cuadro séptico.

Por otro lado, se determinó la posible implicación de las infecciones intestinales por helmintos, y más concretamente por *Anisakis*, en el desarrollo de septicemia. Dowling *et al.* (2002) sugirieron la posibilidad de que los nematodos capaces de atravesar el intestino, como *Ascaris* y *Strongyloides*, podrían presentar un papel importante durante la infección no tifoidea por *Salmonella* en pacientes diagnosticados con VIH. Salgame *et al.* (2013) propusieron la influencia de macrófagos activados y CDs tolerogénicas, derivados de la acción propia del helminto sobre la respuesta del sistema inmune, en respuestas protectoras frente a enfermedades infecciosas. Elias *et al.* (2006) concluyeron que las infecciones por helmintos intestinales suponen un factor de riesgo para el desarrollo de tuberculosis activa en pacientes VIH positivos. George *et al.* (2014) demostraron que las infecciones por helmintos tienen consecuencias moduladoras sobre las respuestas Th1 y Th17 desencadenadas por los antígenos propios de micobacterias en tuberculosis latentes, proceso dependiente de IL-10. Además, estudios previos mostraron como pacientes infectados con helmintos presentaron translocación de microorganismos a través de membranas. Así mismo, los helmintos son capaces de inducir mastocitosis intestinal, la cual, disminuye la expresión de moléculas responsables de la adhesión física de las células del epitelio del intestino entre sí y, por tanto, aumentaría la permeabilidad de este, ocasionando, entre otros, la translocación de endotoxinas en pacientes infectados (Farid *et al.*, 2008). Hübner *et al.* (2013) revisaron el impacto de los helmintos y sus productos sobre la potenciación de la endotoxemia y el estímulo inmunológico inducido posteriormente por diferentes bacterias patógenas. Aunque por otro lado, sugirieron también que algunos helmintos podrían prevenir una respuesta inflamatoria excesiva por parte del sistema inmunitario, así como reducir los procesos de coagulación y el establecimiento del cuadro séptico. Sin embargo, otros podrían invalidar el control del sistema inmunitario sobre las bacterias, facilitando así su replicación y translocación sistémica. Por todo ello, algunos helmintos podrían considerarse factores de riesgo en cuanto al desarrollo de septicemia, aumentando la mortalidad.

Por otro lado, se encontró una relación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-*A. simplex* y los niveles de los marcadores de inflamación (proteína C reactiva y procalcitonina), así como con los marcadores de severidad (ácido láctico). Este hecho sugiere la existencia de una relación entre los marcadores de inflamación y los contactos previos con larvas de *Anisakis* sp. Además, los niveles altos de IgG anti-*A. simplex* se relacionaron tanto con la mayor gravedad de la sepsis como con la positividad de los hemocultivos. Esto se explica, probablemente, por una mayor deficiencia de LT $\gamma\delta$ en pacientes sépticos (Andreu-Ballester *et al.*, 2013), fundamentales en la defensa de las mucosas, y que predispone a una mayor entrada, o reactivación de la infección por *Anisakis* y de otros gérmenes.

Se ha demostrado que los LT $\gamma\delta$ humanos (V δ 2+) son capaces de inducir IgG, IgA e IgM, pero no la producción de IgE por las células B (Petrasca y Doherty, 2014). La IgA es la inmunoglobulina más frecuente en las mucosas, principal vía de entrada de los patógenos, lugar donde más se acumulan los LT $\gamma\delta$. De este modo, se ha descrito que los ratones deficientes en LT $\gamma\delta$ no son capaces de sintetizar IgA, lo cual sugiere que los

LT $\gamma\delta$ están implicados en la regulación de la síntesis de IgA por parte de los linfocitos B (Fujihashi, 1996). Toyabe *et al.* (2001) observan que los LT $\gamma\delta$ son los responsables del cambio de clase a IgA específica en la nefropatía asociada a este isotipo o enfermedad de Berger. Así, la relación encontrada en este estudio entre la producción de IgA anti-*A. simplex* y los LT $\gamma\delta$, confirmaría el papel de estas células en la síntesis de IgA por los linfocitos B específicos de los antígenos de *Anisakis*.

Anteriormente, se demostró que los LT $\gamma\delta$ están relacionados con la severidad y el pronóstico de pacientes sépticos. Los LT $\gamma\delta$ mostraron el mayor descenso y esta reducción se agravó con la severidad del cuadro séptico (Andreu-Ballester *et al.*, 2013). De hecho, la deficiencia en la subpoblaciones de células T se incrementó con la severidad de la sepsis. Igualmente, sería lógico pensar que a menor cantidad de LT $\gamma\delta$, menor producción de IgA anti-*A. simplex* y por tanto menor protección frente al parásito y peor pronóstico. Estos hechos fueron observados en nuestro estudio (Figura 165 A), donde el descenso de IgA anti-*A. simplex* fue superior que el observado en el resto de isotipos determinados, de acuerdo con el empeoramiento del proceso. Los niveles de IgA anti-*A. simplex* observados en el grupo con shock séptico fueron un 50% inferiores a los observados en el grupo de pacientes sépticos sin complicaciones orgánicas. Por tanto, no debería sorprendernos que haya una relación inversamente proporcional entre la severidad de la sepsis (índices APACHE y SOFA) y las inmunoglobulinas anti-*A. simplex* (IgA e IgM). Los pacientes sépticos con déficit de LT $\gamma\delta$ podrían no ser capaces de producir suficiente IgM e IgA para combatir la infección/reinfección del parásito. Esto podría a su vez empeorar el pronóstico del proceso séptico.

Resulta interesante conocer el hecho de que el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta que los pacientes fueron tratados en las Urgencias/Unidad de Cuidados Intensivos, fue inversamente proporcional a los niveles de IgA anti-*A. simplex*. Es decir, a mayor tiempo de evolución del cuadro séptico, los niveles de IgA fueron menores. Así mismo, el tiempo de evolución se relacionó, en un estudio previo, con bajos niveles de LT $\gamma\delta$, así como con una mayor severidad del cuadro séptico y un peor pronóstico (Andreu-Ballester *et al.* 2013).

En conclusión, los niveles de IgG anti-*A. simplex* fueron mayores en los pacientes que desarrollaron los cuadros más graves, y como consecuencia, el número de pacientes positivos frente a *A. simplex* fue superior en los pacientes con sepsis grave. No solo eso, sino que este aumento en los niveles de IgG se relacionó directamente con los niveles de procalcitonina, PCR, ácido láctico y la positividad de los hemocultivos frente a gérmenes en sepsis.

Finalmente, para el resto de isotipos específicos testados, especialmente IgA, estos se vieron disminuidos a medida que el proceso séptico avanzó. Este descenso fue mayor en los pacientes con sepsis más grave.

En conclusión, existe una relación directa entre los niveles de IgA anti-*A. simplex* y los LT $\gamma\delta$. El descenso de los niveles de IgA anti-*A. simplex* se asoció negativamente con el

tiempo de admisión y con la gravedad de la sepsis, así como con el aumento de los índices APACHE y SOFA.

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se diferenciaron dos tipos de respuestas en las células dendríticas derivadas de médula ósea en las dos cepas de ratón estudiadas, BALB/c y C57BL/6, tras su estimulación *in vitro* con antígenos larvarios de *A. simplex*. La cepa BALB/c resultó más susceptible, generando una respuesta de carácter agudo e inflamatorio, con mayor expresión de IL-12 y menor de IL-10 que en los ratones C57BL/6, los cuales desarrollaron una respuesta más discreta y resistente (Anexo I).
2. Con este estudio se confirma la coexistencia de dos respuestas de carácter opuesto: Th1 *versus* Th2, generada por los antígenos larvarios de *A. simplex*, a través de la inducción, por un lado de CDs inmaduras productoras de IL-10 y, por otro, CDs inflamatorias sintetizadoras de citocinas proinflamatorias (IL-12 y TNF- α).
3. Los productos larvarios de *A. simplex* modificaron de forma significativa las respuestas desencadenadas por los agonistas de los TLR sobre las CDs, sugiriendo la existencia de mecanismos específicos por parte del parásito encaminados a la modulación del sistema inmunitario del hospedador.
4. Los productos de excreción-secreción y el extracto total de *A. simplex* dan lugar a CDs tolerogénicas que inducen la expansión de linfocitos T reguladores funcionales *in vitro*, productores de IL-10 e IFN- γ , que podrían estar implicados en la supresión de las respuestas Th1 y/o Th2 desarrolladas al inicio de la infección (Anexos 2,3,4 y 5).
5. Los efectos producidos por los productos larvarios de *A. simplex* en los ensayos de inhibición de la linfoproliferación señalan la existencia de ciertos mecanismos reguladores por parte del parásito y confirman que la base genética del hospedador es primordial en el desarrollo de una respuesta Th2 o T_{reg}.
6. La correlación inversamente proporcional observada entre las células NKT $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ y los anticuerpos específicos anti-*A. simplex*, con excepción de la IgG, orienta hacia un posible papel de las células NKT en la inmunidad innata frente a este parásito. A su vez, esto estaría relacionado con la disminución de la población de células NKT en los sujetos con niveles detectables de anticuerpos específicos anti-*A. simplex*, en especial, el descenso de las células T $\gamma\delta$ +
7. Se proponen los anticuerpos IgA específicos como protectores frente a la infección por *Anisakis* y los LT $\gamma\delta$ como compensadores de la deficiencia de este

isotipo de inmunoglobulina por la existencia de una correlación inversa de ambos marcadores en sujetos sanos.

8. El aumento de los niveles de IgG anti-*A. simplex*, en relación a la severidad del cuadro séptico, así como los niveles de los marcadores de inflamación, indica que aquellos pacientes previamente inmunizados a dicho parásito, podrían desarrollar un cuadro séptico más grave.
9. El resto de isotipos específicos testados, especialmente IgA, disminuyeron a medida que el proceso séptico avanzó. Este descenso fue mayor en los pacientes con sepsis más grave.
10. Existe una relación directa entre los niveles de IgA anti-*A. simplex* y los LT $\gamma\delta$. El descenso de los niveles de IgA anti-*A. simplex* se asoció negativamente con el tiempo de admisión y con la gravedad de la sepsis, así como con el aumento de los índices APACHE y SOFA.

IX. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aalberse R.C.**, Stapel S.O., Schuurman J., Rispens T. (2009), "Immunoglobulin G4: an odd antibody", *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 39:4, pp. 469-77.
- Abollo E.**, Gestal C. y Pascual S. (2001) "Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis*", *J. Helminthol.*, Vol. 75, pp. 209-214.
- Abu-Amero K.K.** y Bosley T.M. (2005), "Detection of Mitochondrial Respiratory Dysfunction in Circulating Lymphocytes Using Resazurin", *Arch. Pathol. Lab. Med.*, Vol. 129.
- AECOSAN** (2016), "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la alergia a *Anisakis*", *Revista del Comité Científico del AECOSAN*, Vol. 24, 23-34.
- Agrawal S.**, Agrawal A., Doughty B., Gerwitz A., Blenis J., Van Dyke T. y Pulendran B., (2003), "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos", *J. Immunol.*, Vol. 171, p. 4984.
- Aguinaldo A.M.**, Turbeville J.M., Linford L.S., Rivera M.C., Garey J.R., Raff R.A. y Lake J.A. (1997), "Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals", *Nature*, Vol. 387, pp. 489-493.
- Ahmed S.A.**, Gogal R.M. y Walsh J.E. (1994), "New rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay", *J. Immunol. Meth.*, Vol. 170, pp. 211-224.
- Alexander A.A.**, Maniar A., Cummings J.S., Hebbeler A.M., Schulze D.H. y Gastman B.R. (2008), "Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ gammadelta T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma", *Clin. Cancer Res.*, Vol. 14, pp. 4232-4240.
- Allen J.E.** y Maizels R.M. (2011), "Diversity and dialogue in immunity to helminths", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 11:6, pp. 375-388.
- Allison T.J.**, Winter C., Fournié J.J. y Bonneville M. (2001), "Structure of a human big gammadelta T-cell antigen receptor", *Nature*, Vol. 411, pp. 820-824.
- Alonso A.**, Daschner A. y Moreno-Ancillo A. (1997), "Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa", *N. Engl. J. Med.*, Vol. 337, pp. 350-351.
- Alonso A.**, Moreno-Ancillo A., Daschner A., López-Serrano M.C. (1999), "Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiosis", *Allergy*, Vol. 54, pp. 517-520.
- Álvarez J.I.** (2005), "Inhibition of Toll like receptor immune responses by microbial pathogens", *Front. Biosci.*, Vol. 10, pp. 582-587.
- Anadón A.M.**, Rodríguez E., Gárate M.T., Cuéllar C., Romarís F., Chivato T., Rodero M., González-Díaz H. y Ubeira F.M. (2010), "Diagnosing human anisakiosis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay", *Clin. Vaccine Immunol.*, Vol. 17:4, pp. 496-502.
- Anadón A.M.**, Romarís F., Escalante M., Rodríguez E., Gárate T., Cuéllar C. y Ubeira F.M. (2009), "The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections", *Clin. Exp. Immunol.*, Vol. 156, pp. 471-478.

- Andreu-Ballester J.C.**, Tormo-Calandín C., García-Ballesteros C., Pérez-Griera J., Amigó V., Almela-Quilis A., Ruiz del Castillo J., Peñarroja-Otero C. y Ballesteri F. (2013), "Association of $\gamma\delta$ T Cells with Disease Severity and Mortality in Septic Patients", *Clin. Vaccine Immunol.*, Vol. 5, pp. 738-746.
- Andreu-Ballester J.C.**, Tormo-Calandín C., García-Ballesteros C., Amigó V., Peiro-Gomez A., Ruiz del Castillo J., Penarroja-Otero C., Ballester F., Fenoy S. y del Águila C. Cuéllar C. (2014), "Increase of IgE anti-Encephalitozoon cuniculi antibodies levels in septic patients", *Clin. Cell. Immunol.*, Vol. 5, p. 4.
- Anwar M.A.**, Basith S., Choi S. (2013), "Negative regulatory approaches to the attenuation of toll-like receptor signaling", *Exp. Mol. Med.*, Vol. 45, p. 11.
- Añíbarro B.** y Seoane F.J. (1998), "Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 102, pp. 331-332.
- APROMAR** (Asociación Empresarial de productores de Cultivos marinos) (2012), *Evaluación de la presencia de nematodos del genero Anisakis en los pescados de acuicultura marina españoles*.
- Aranzamendi C.**, Fransen F., Langelaar M., Franssen F., van der Ley P., van Putten J.P., Rutten V. y Pinelli E. (2012), "*Trichinella spiralis*-secreted products modulate DC unctonality and expand regulatory T cells *in vitro*", *Parasite Immunol.*, Vol. 34, pp. 210-223.
- Araujo C.A.**, Perini A. y Martins M.A. (2008), "PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN- γ , but not IL-12," *Cytokine*, Vol. 44:3, pp. 335-341.
- Araujo C.A.**, Perini A. y Martins M.A. (2010), "PAS-1, an *Ascaris suum* protein, odulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+ CD25+ FoxP3+ T Cells," *Scand. J. Immunol.*, Vol. 72:6, pp. 491-503.
- Arduoso D.D.**, Quince S., Díez M.L., Cuevas M., Eiras P., Sánchez M., Sanz S. y Losada E. (1996), "Hipersensibilidad inmediata al parásito del pescado *Anisakis simplex*. Estudio de reactividad cruzada", *Rev. Esp. Alergol. Immunol. Clin.*, Vol. 1996:2, pp. 280-286.
- Aristimuño Villamayor C.** (2008), *Caracterización de Linfocitos T reguladores y Células dendríticas en pacientes con Esclerosis Múltiple Remitente-Reminente*, Tesis Doctoral por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.
- Arlian L.G.**, Morgan M., Quirce, S., Marañón F. y Fernández-Caldas E. (2003), "Characterization of allergens of *Anisakis simplex*", *Allergy*, Vol. 58, pp. 1299-1303.
- Armentia A.**, Lombardero M., Callejo A., Martín Santos J.M., Gil F.J., Vega J., Arranz M.L. y Martínez C. (1998), "Occupational asthma by *Anisakis simplex*", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 102, pp. 831-834.
- Artis D.**, Kane C.M. y Fiore J. (2005), "Dendritic cell-intrinsic expression of NF-kappaB1 is required to promote optimal Th2 cell differentiation", *J. Immunol.*, Vol. 174, p. 7154.
- Asaishi K.**, Nishino C., Ebata T., Totsuka M., Hayasaka H. y Suzuki T. (1980), "Studies on the etiologic mechanism of anisakiosis. 1. Immunological reactions of digestive tract induced by *Anisakis* larva", *Gastroenterol. Jpn.*, Vol. 15, pp. 120-127.
- Ashour D.S.**, Othman A.A., Shareef M.M., Gaballah H.H. y Mayah W.W. (2014), "Interactions between *Trichinella spiralis* infection and induced colitis in mice", *J. Helminthol.*, Vol. 88:2, pp. 210-218.
- Asma A.**, Dhanusha Y. y Sangdun C. (2016), "Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases", *Arch. Pharm. Res.*, Vol. 39, pp. 1032-1049.
- Asturias J.A.**, Eraso E. y Martínez A. (2000), "Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform", *Mol. Biochem. Parasitol.*, Vol. 108, pp. 263-267.

- Audicana M.**, Ansotegui I., de Corres L. y Kennedy M. (2002), "*Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive?", *Trends Parasitol.*, Vol. 18, pp. 20-25.
- Audicana M.**, Fernández L., Muñoz M., Fernández E., Navarro J. y Del Pozo D. (1995), "Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 96, pp. 558-560.
- Audicana M.** y Kennedy M. (2008), "*Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity", *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 21:2, pp. 360-379.
- Badley J.E.**, Grieve R.B., Bowman D.D., Glickman L.T. y Rockey J.H. (1987), "Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition", *J. Parasitol.*, Vol. 73, pp. 593-600.
- Baeza M.L.**, Conejero L., Higaki Y., Martín E., Pérez C. e Infante S. (2005), "*Anisakis simplex* allergy: a murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern", *Clin. Exp. Immunol.*, Vol. 142, pp. 433-440.
- Baeza M.L.**, Rodríguez A., Matheu V., Rubio M., Tornero P., de Barrio M., Herrero T., Santaolalla M. y Zubeldia J.M. (2004), "Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens", *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 34, pp. 296-302.
- Baeza M.L.**, Zubeldia J. y Rubio, M. (2001), "*Anisakis simplex* allergy", *ACI International*, Vol. 13, pp. 242-249.
- Bai L.**, Picard D., Anderson B., Chaudhary V., Luoma A., Jabri B., Adams E.J., Savage P.B., Bendelac A. (2012), "The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 42, pp. 2505-2510.
- Baird F.J.**, Gasser R.B., Jabbar A. y Lopata A.L. (2014), "Foodborne anisakiosis and allergy", *Mol. Cell. Probes*, Vol. 28, pp. 167-174.
- Balic A.**, Harcus Y., Holland M.J. y Maizels R.M. (2004), "Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis* secreted proteins drives Th2 immune responses", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 34:11, pp. 3047-3059.
- Balmer P.** y Devaney E. (2002), "NKT cells are a source of early interleukin- 4 following infection with third-stage larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*", *Infect. Immun.*, Vol. 70, pp. 2215-2219.
- Barbuzza O.**, Guarneri F., Galtieri G., Gangemi S. y Vaccaro M. (2009) "Protein contact dermatitis and allergic asthma caused by *Anisakis simplex*", *Contact Dermatitis*, Vol. 60, pp. 239-240.
- Baron L.**, Branca G., Trombetta C., Punzo E., Quarto F., Speciale G. y Barresi V. (2014), "Intestinal anisakidosis: histopathological findings and differential diagnosis", *Pathol. Res. Pract.*, Vol. 210:11, pp. 746-50.
- Bashi T., Bizzaro G., Ben-Ami Shor D., Blank M. y Shoenfeld Y. (2015), "The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity", *Autoimmun. Rev.*, Vol. 14, pp. 98-104.
- Bavastrelli M.**, Riccardo F., Binazzi R. y Sanguigni S. (2001), "Small intestine anisakiosis", *J. Ital. Med. Trop.*, Vol. 6, pp. 49-50.
- Bendelac A.**, Savage P.B. y Teyton L. (2007), "The biology of NKT cells", *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 25, pp. 297-336.
- Benet Campos M.C.** (2015), *Determinación de anticuerpos anti-Anisakis y relación con las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en pacientes con enfermedad de Crohn*, Tesis Doctoral, Facultat de Medicina i Odontologia, Departament de Medicina, Universitat de Valencia.

- Benet-Campos C.**, Cuéllar C., García-Ballesteros C., Zamora V., Gil-Borrás R., Catalán-Serra I., López-Chuliá F. y Andreu-Ballester J.C. (2017), "Determination of Anti-*Anisakis simplex* Antibodies and Relationship with $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ Lymphocyte Subpopulations in Patients with Crohn's Disease", *Dig. Dis. Sci.*, Vol. 62:4, pp. 934-943.
- Berland B.** (1961), "Nematodes from some Norwegian marine fishes", *Sarsia*, Vol. 2, pp. 1-50.
- Berthelot J.M.** y Maugars Y. (2004), "Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). Facts and hypotheses", *Joint Bone Spine*, Vol. 71:5, pp. 374-80.
- Beyer M.** y Schultze J. (2006), "Regulatory T cells in cancer", *Blood*, Vol. 108, pp. 804-811.
- Bier J.W.** y Raybourne R.B. (1998), "*Anisakis simplex* (Nematoda:Ascaridoidea): formation of immunogenic attachment caps in pigs", *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, Vol. 55, pp. 91-94.
- Van den Biggelaar A.H.**, Rodrigues L.C., van Ree R., van der Zee J.S., Hoeksma-Kruize Y.C. y Souverein J.H. (2004), "Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren", *J. Infect. Dis.*, Vol. 189, pp. 892-900.
- Björkstén B.**, Crevel R., Hischenhuber C., Løvik M., Samuels F., Strobel S., Taylor S., Wal J. y Ward R. (2008), "Criteria for identifying allergenic foods of public health importance", *Regul. Toxicol. Pharm.*, Vol. 51, pp. 42-52.
- Blaxter M.** (2009), "Nematodes (Nematoda)", en S.B. Hedges y S. Kumar (Eds.), *The Timetree of Life*, Oxford, Oxford University Press, pp. 247-250.
- Bondeson J., Browne K.A., Brennan F.M., Foxwell B.M. y Feldmann M. (1999), "Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent", *J. Immunol.*, Vol. 162:5, pp. 2939-2945.
- Bonneville M., O'Brien R.L., Born W.K. (2010), "Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 10, pp. 467-478.
- Borkow G.** y Bentwich Z. (2004), "Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy", *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 17:4, pp. 1012-1030.
- Borrelli M.**, Maglio M., Agnese M., Paparo F., Gentile S., Colicchio B., Tosco A., Auricchio R. y Troncone R. (2010), "High density of intraepithelial gammadelta lymphocytes and deposits of immunoglobulin (Ig)M anti-tissue transglutaminase antibodies in the jejunum of coeliac patients with IgA deficiency", *Clin. Exp. Immunol.*, Vol. 160, pp. 199-206.
- Bradford M.M.** (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, Vol. 72, pp. 248-254.
- Brandes M.**, Willmann K., Bioley G., Lévy N., Eberl M. y Luo M. (2009), "Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 106, pp. 2307-2312.
- Brandtzaeg P.**, Farstad I.N., Helgeland L. (1998), "Phenotypes of T cells in the gut", *Chem. Immunol.*, Vol. 71, pp. 1-26.
- Brasó J.** y Jorro G. (2003), *Manual de Alergia Clínica*, Barcelona, Masson.
- Caballero M.L.**, Umpierrez A., Moneo I. y Rodríguez-Pérez R. (2011), "*Anisakis simplex* 10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression", *Parasitol. Int.*, Vol. 60, pp. 209-212.

- Calleja S.**, Vivas S., Santiuste M., Arias L., Hernando M., Nistal E., Casqueiro J. y Ruiz de Morales J.G. (2011), "Dynamics of nonconventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and $\gamma\delta$ T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology", *Dig. Dis. Sci.*, Vol. 56, pp. 2042–2049.
- Caraballo L.**, Acevedo N. (2011), "Allergy in the tropics: the impact of cross-reactivity between mites and ascaris", *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, Vol. 1:3, pp. 51-64.
- Carballeda-Sangiao N.**, Olivares F., Rodriguez-Mahillo A.I., Careche M., Tejada M., Moneo I. y González-Muñoz M. (2014), "Identification of autoclave-resistant *Anisakis simplex* allergens", *J. Food Prot.*, Vol. 77:4, pp. 605-609.
- Carvalho L., Sun J. y Kane C. (2009), "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function", *Immunol.*, Vol. 126:1, pp. 28–34.
- Céspedes R.**, Iannacone J. y Salas A. (2011), "Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* "Pota" eviscerada en Arequipa", *Perú Ecol. Apl.*, Vol. 10:1, pp. 1-11.
- Chang, C.C. et al.** (2002), "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4", *Nat. Immunol.*, Vol. 3:3, pp. 237-243.
- Chen J.** y Liu X.S. (2009), "Development and function of IL-10 IFN- γ -secreting CD4(+) T cells", *J. Leukoc. Biol.*, Vol. 86:6, pp. 1305-1310.
- Cheng T.** (1982), "*Anisakis*", en C. Holland y H.V. Smith (Eds.), *Handbook series in zoonoses: parasitic zoonoses*, Florida, CRC Press, pp. 37-52.
- Chien Y.**, Meyer C. y Bonneville M. (2014), " $\gamma\delta$ T cells: First line of defense and beyond", *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 32, pp. 121-155.
- Chirdo F.G.**, Millington O.R., Beacock-Sharp H y, Mowat A.M. (2005), "Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 35:6, pp. 1831-1840.
- Cho M.K.**, Ahn S.C., Kim D.H. y Yu H.S. (2010), "Parasite excretory-secretory proteins elicit TRIF dependent CXCL1 and IL-6 mediated allergic inflammation", *Parasite Immunol.*, Vol. 32, pp. 354-360.
- Cho M.K.**, Lee C.H. y Yu H.S. (2011), "Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through Toll-like receptor 2", *Parasite Immunol.*, Vol. 33, pp. 265-275.
- Cho M.K.**, Park M.K., Kang S.A., Park S.K., Lyu J.H., Kim D.H., Park H.H. y Yu H.S. (2015), "TLR2 dependent amelioration of allergic airway inflammation by parasitic nematode type II MIF in mice", *Parasite Immunol.*, Vol. 37:4, pp. 180-91.
- Chun Yuen J.C.**, Ysebaert D., Zwi N.B., Cools N. (2013), "Dendritic Cells: Cellular Mediators for Immunological Tolerance", *Clin. Dev. Immunol.*, Vol. 10.
- Colley D.G.**, García A.A., Lambertucci J.R., Parra J.C., Katz N. y Rocha R.S. (1986), "Immune responses during human schistosomiasis. XII. Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 35, pp. 793–802.
- Cooke A.**, Tonks P., Jones F.M., O'Shea H., Hutchings P., Fulford A.J. y Dunne D.W. (1999), "Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice", *Parasite Immunol.*, Vol. 21:4, pp. 169-176.
- Cooper P.** (2009), "Interactions between helminth parasites and allergy", *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 9, pp. 29–37.

- Cooper P.J.**, Barreto M.L. y Rodrigues L.C. (2006), "Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations", *Br. Med. Bull.*, Vol. 79-80, pp. 203-218.
- Cooper P.J.**, Espinel I., Paredes W., Guderian R.H. y Nutman T.B. (1998), "Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10", *J. Infect. Dis.*, Vol. 178:4, pp. 1133-1138.
- Cottrez, F.** y Groux, H. (2004), "Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells", *Transplantation*, Vol. 77, pp. 12-15.
- Croese J.**, O'neil J., Masson J., Cooke S., Melrose W., Pritchard D. y Speare R. (2006), "A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors", *Gut*, Vol. 55:1, pp. 136-137.
- Croft A.M.**, Bager P. y Kumar S. (2012), "Helminth therapy (worms) for allergic rhinitis", *Cochrane Database Syst. Rev.* 4.
- Cuéllar C. et al.** (1995), "Cross reactions of Sera from *Toxocara leonina* and *Ascaris suum* infected mice with *Toxocara canis*, *Toxocara leonina* and *Ascaris suum* antigens", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 25:6, pp. 731-739.
- Cuéllar C.**, Fernández-Fígares V., Rodero M., Valls A., Frutos C. y Daschner A. (2012), "Cytokine production in gastro-allergic anisakiosis and associated chronic urticaria", *Eur. Multicoll. Parasitol.*, Vol. 11.
- Cuéllar M.**, Fontanillas J. y Pérez-Fuentes, J. (1991), "Biología y epidemiología de las anisakidosis larvaria. Enfermedad del arenque", *Ciencias Veterinarias*, Vol. 4, pp. 57-61.
- Cuéllar C.**, Perteguer M.J. y De Las Heras B. (1998), "Effects of *Anisakis simplex* on nitric oxide production in J774 macrophages", *Scand. J. Infect. Dis.*, Vol. 30:6, pp. 603-606.
- Cuéllar C.**, Perteguer M.J. y Rodero M. (2001), "Presence of IL-4 molecules in Larval Excretory-Secretory Products and Crude Extracts from *Anisakis simplex*", *Scand. J. Immunol.*, Vol. 53, pp. 483-488.
- Cuéllar C.**, Rodero M., Bolás F. y Martínez A.R. (1997), "The effects of *Polypodium leucotomos* extract on the specific antibody patterns in BALB/c mice immunized with third stage larvae antigens of *Anisakis simplex*", *Int. J. Pharm.*, Vol. 35, pp. 153-160.
- Cuéllar C.**, Valls A., de Frutos C., Rodero M. y Daschner A. (2013), "Avidity Studies in *Anisakis simplex*-Associated Allergic Diseases", *J. Allergy*, Vol. 35.
- Cvetkovic J.**, Ilic N., Sofronic-Milosavljevic L. y Gruden-Movsesijan A. (2014), "Glycans expressed on *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens are important for antiinflammatory immune response polarization", *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, Vol. 37:5-6, pp. 355-367.
- Daschner A.**, Alonso-Gómez A. y Caballero T. (1998), "Gastric anisakiosis: an underestimated cause of acute urticaria and angio-oedema?", *Br. J. Dermatol.*, Vol. 139, p. 822.
- Daschner A.**, Alonso-Gómez A. y Caballero T. (1999), "Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiosis", *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 29, p. 1260.
- Daschner A.**, Alonso-Gómez A. y Cabañas R. (2000), "Gastroallergic anisakiosis: borderline between food allergy and parasitic disease -clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*", *J. Allergy. Clin. Immunol.*, Vol. 105, pp. 178-181.

- Daschner A.** y Cuéllar C. (2010), "The hidden sense of symptoms: Urticaria can be beneficial", *Med. Hypotheses*, Vol. 75:6, pp. 623-626.
- Daschner A.**, Cuéllar C., Alonso-Gómez A., Pascual C.Y. y Martín-Esteban M. (2001), "Serum CD23 is not altered in gastroallergic anisakiosis, but correlates with the production of specific IgE and the amount of polyclonal stimulation", *Allergy*, Vol. 56:10, pp. 1003-1007.
- Daschner A.**, Cuéllar C., Sánchez S., Pascual C. y Martín M. (2002), "Gastro-allergic anisakiosis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response", *Parasite Immunol.*, Vol. 24, pp. 243-251.
- Daschner A.**, Fernández-Fígares V., Rodero M., Valls A., De Frutos C., Ubeira F.M. y Cuéllar C. (2014), "Specific IgG4: possible role in the pathogenesis and a new marker in the diagnosis of *Anisakis*-associated allergic disease", *Scand. J. Immunol.*, Vol. 79:2, pp. 120-126.
- Daschner A.**, Fernández-Fígares V., Valls A., de Frutos C., Rodero M., Ubeira F.M. y Cuéllar C. (2013), "Different fish-eating habits and cytokine production in chronic urticaria with and without sensitization against the fish-parasite *Anisakis simplex*", *Allergol. Int.*, Vol. 62:2, pp. 191-201.
- Daschner A.**, Rodero M., De Frutos C., Valls A., Vega F., Blanco C. y Cuéllar C. (2011), "Different serum cytokine levels in chronic vs. acute *Anisakis simplex* sensitization-associated urticaria", *Parasite Immunol.*, Vol. 33:6, pp. 357-362.
- Daniłowicz-Luebert E.**, O'Regan N.L., Steinfeld S. y Hartmann S. (2011), "Modulation of Specific and Allergy-Related Immune Responses by Helminths", *J. Biomed. Biotechnol.*, Vol. 89.
- Deardorff T.L.**, Altman J. y Nolan C.M. (1987), "Human anisakiosis: two case reports from the state of Washington", *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, Vol. 54, pp. 274-275.
- Deardorff T.L.**, Fukumura T. y Raybourne R.B. (1986), "Invasive anisakiosis. A case report from Hawaii", *Gastroenterol.*, Vol. 90, pp. 1047-1050.
- Deardorff T.L.**, Kayes S.G. y Fukumura T. (1991), "Human anisakiosis transmitted by marine food products", *Hawaii Med. J.*, Vol. 50, pp. 9-16.
- Deardorff T.** y Kent M. (1989), "Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington", *J. Wildl. Dis.*, Vol. 25, pp. 416-419.
- Dellinger R.P.**, Carlet J.M. y Masur H. (2004), "Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock", *Intensive Care Med.*, Vol. 30, pp. 536-555.
- Ding T.**, Yan F., Cao S. y Ren X. (2015), "Regulatory B cell: new member of immunosuppressive cell club", *Human Immunol.*, In press.
- Doganci A.**, Neurath M.F. y Finotto S. (2005), "Mucosal immunoregulation: transcription factors as possible therapeutic targets", *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, Vol. 4:5, pp. 565-575.
- Domínguez Ortega J.** y Martínez-Cócer C. (2000), "Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*", *Alergol. Immunol. Clin.*, Vol. 15, pp. 267-272.
- Donnelly S.**, O'Neill S.M. y Stack C.M. (2010), "Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3", *J. Biol. Chem.*, Vol. 285:5, pp. 3383-3392.
- Dooley J.R.** y Neafie R.C. (1976), "Pathology of tropical and extraordinary diseases. (Binford, C, Dooner, C.). Armed forces", *Inst. Pathol.*, review.
- Dorner T.**, Jacobi A.M. y Lipsky P.E. (2009), "B cells in autoimmunity", *Arthr. Res. Ther.*, Vol. 11:5.

- Dowling D.J.**, Noone C.M. y Adams P.N. (2010), "*Ascaris lumbricoides* pseudocoelomic body fluid induces a partially activated dendritic cell phenotype with Th2 promoting ability *in vivo*," *Int. J. Parasitol.*, Vol. 41:2, pp. 255-261.
- Du L.**, Liu L., Yu Y., Shan H. y Li L. (2014a), "*Trichinella spiralis* excretory-secretory products protect against polymicrobial sepsis by suppressing MyD88 via mannose receptor", *Bio. Med. Res. Int.*, Vol. 1, pp. 1-11.
- Du L.**, Wei H., Li L., Shan H., Yu Y., Wang Y. y Zhang G. (2014b), "Regulation of recombinant *Trichinella spiralis* 53 kDa protein (rTsP53) on alternatively activated macrophages via STAT6 but not IL-4R _ *in vitro*", *Cell. Immunol.*, Vol. 288, pp. 1-7.
- Dudley E.C.**, Girardi M., Owen M.J. y Hayday A.C. (1995), "Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor", *Curr. Biol.*, Vol. 5, pp. 659-669.
- Eardley D.D. et al.** (1978) "Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition", *J. Exp. Med.*, Vol. 147:4, pp. 1106-1115.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)** (2010), "Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products", *EFSA J.*, Vol. 8, pp. 1543-1633.
- Van Egmond M. et al.** (2001), "IgA and the IgA Fc receptor", *Trends Immunol.*, Vol. 22, pp. 205-211.
- Eguia A.**, Aguirre J.M., Echevarría M.A., Martínez-Conde R. y Ponton J. (2003), "Gingivostomatitis after eating fish parasitized by *Anisakis simplex*: a case report", *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, Vol. 96:4, pp. 437-440.
- Elias D.**, Akuffo H. y Britton S. (2006), "Helminthes could influence the outcome of vaccines against TB in the tropics", *Parasite Immunol.*, Vol. 28:10, pp. 507-513.
- Elliott D.E.**, Setiawan T., Metwali A., Blum A., Urban J.F. Jr. y Weinstock J.V. (2004), "*Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-10-deficient mice", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 34:10, pp. 2690-2698.
- Else K.J.** (2005), "Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system?", *Parasite Immunol.*, Vol. 27:10-11, pp. 407-415.
- Eskesen A.**, Strand E.A., Andersen S.N., Rosseland A., Hellum K.B. y Strand O.A. (2001), "Anisakiosis presenting as an obstructive duodenal tumor. A Scandinavian case", *Scand. J. Infect. Dis.*, Vol. 33, pp. 75-76.
- European Cytokine Network** (2002), "Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances", *Jonh Libbey Eurotext*, Vol. 13:2.
- Everts B.**, Smits H.H., Hokke C.H. y Yazdanbakhsh M. (2010), "Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 40, pp. 1525-1537.
- Fæste C.K.**, Jonscher K.R., Dooper M.M., Egge-Jacobsen W., Moen A., Daschner A., Egaas E. y Christians U. (2014), "Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*", *EuPA Open Proteom.*, Vol. 4, pp. 140-155.
- Faveeuw C.**, Mallevaey T. y Trottein F. (2008), "Role of Natural Killer T lymphocytes during helminthic infection", *Parasite*, Vol. 15, pp. 384-388.
- Fehervari Z.** y Sakaguchi S. (2004), "CD4+ Tregs and immune control", *J. Clin. Invest.*, Vol. 114, pp. 1209-1217.

- Fernández-Figares V.**, Rodero M., Valls A., De Frutos C., Daschner A. y Cuéllar C. (2015), "Positive associations between infections of *Toxoplasma gondii* and seropositivity with *Anisakis simplex* in human patients suffering from chronic urticaria", *J. Helminthol.*, Vol. 89, pp. 707-713.
- Fillatreau S.**, Sweeney C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderton S.M. (2002), "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10", *Nat. Immunol.*, Vol. 6, pp. 944-950.
- Fincham J.E.**, Markus M.B. y Adams V.J. (2003), "Could control of soil-transmitted helminthic infection influence the HIV/AIDS pandemic", *Acta Trop.*, Vol. 86:2-3, pp. 315-33.
- La Flamme A.C.**, Ruddenklau K. y Bäckström B.T. (2003), "Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis", *Infect. Immun.*, Vol. 71:9, pp. 4996-5004.
- Fumagalli M.**, Pozzoli U., Cagliani R., Comi G.P., Riva S., Clerici M., Bresolin N. y Sironi M. (2009), "Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions", *J. Exp. Med.*, Vol. 206:6, pp. 1395-1408.
- Flo T.H.**, Halaas O., Lien E., Ryan L., Teti G., Golenbock D.T., Sundan A. y Espevik T. (2000), "Human Toll-Like Receptor 2 Mediates Monocyte Activation by *Listeria monocytogenes*, But Not by Group B Streptococci or Lipopolysaccharide", *J. Immunol.*, Vol. 164:4, pp. 2064-2069.
- Fredericksen, D.** y Specian, R. (1981), "The value of cuticular fine structure in identification of juvenile anisakine nematodes", *J. Parasitol.*, Vol. 67, pp. 647-655.
- Fujii S.I.**, Shimizu K., Okamoto Y., Kunii N., Nakayama T., Motohashi S. y Taniguchi M. (2013), "NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic", *Frontiers Immunol.*, Vol. 4, p. 409.
- Fukuda T.**, Aji T. y Tonga Y. (1988), "Surface ultrastructure of larval Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) and its identification by mensuration", *Acta. Med. Okayama*, Vol. 42, pp. 105-116.
- García-Hernández P.**, Rodero M. y Cuéllar C. (2007), "*Anisakis simplex*: The activity of larval products on the complement system", *Exp. Parasitol.*, Vol. 115:1, pp. 1-8.
- García-Hernández P.**, Rodero M. y Cuéllar C. (2009), "Study of the Effect of *Anisakis simplex* Larval Products on the early and Late Components in the Classical Complement Pathway", *J. Parasitol.*, Vol. 95:1, pp. 240-241.
- García-Hernández P.**, Rodero M., Gisbert-Criado R., Puente P., Pelayo V., Andreu-Ballester J.C. y Cuéllar C. (2012), "The effect of anti-*Anisakis simplex* antibody levels on C3 and C4 complement components in human sera", *J. Helminthol.*, Vol. 86:2, pp. 197-201.
- García-Palacios L.**, González M.L. y Esteban M.I. (1996), "Enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblot analysis and RAST fluoroimmunoassay analysis of serum responses against crude larval antigens of *Anisakis simplex* in a Spanish random population", *J. Helminthol.*, Vol. 70, p. 281.
- Garg S.K.**, Croft A.M. y Bager P. (2014), "Helminth therapy (worms) for induction of remission in inflammatory bowel disease", *Cochrane Database Syst. Rev.*, Vol. 1.
- Garrido-Mesa N.**, Algieri F., Rodríguez Nogales A. y Gálvez J. (2013), "Functional plasticity of Th17 cells: implications in gastrointestinal tract function", *Int. Rev. Immunol.*, Vol. 32:5-6, pp. 493-510.
- Gaudieri S.**, Tulic M.K., Lucas A. y Lucas M. (2012), "IFN- λ and IgE-mediated allergic disease: a potential future role?", *Biomark. Med.*, Vol. 6:2, pp. 151-157.
- Gil Borrás R.** (2015), *Relación de los linfocitos B1 (CD19+ CD5+) con la enfermedad de Crohn*, Tesis Doctoral, Departamento de Medicina, Universitat de València.

- Gilliet M.**, Liu Y.J. (2002) "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells", *J. Exp. Med.*, Vol. 195:6, pp. 695-704.
- Godfrey D.I.**, MacDonald H.R., Kronenberg M., Smyth M.J. y Van Kaer L. (2004), "NKT cells: what's in a name?", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 4, pp. 231-237.
- Goldsby R.A.**, Kindt T.K., Osborne B.A. y Kuby J. (2003), *Immunology*, New York, WH Freeman and Company.
- Gómez B.**, Tabar A.I. y Tuñón T. (1998), "Eosinophilic gastroenteritis and *Anisakis*", *Allergy*, Vol. 53, p. 1148.
- González-Fernández J.**, Daschner A., Nieuwenhuizen N.E., Lopata A.L., Frutos C.D., Valls A. y Cuéllar C. (2015), "Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 45:6, pp. 399-407.
- Goodman T.**, Lefrancois L. (1988), "Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes", *Nature*, Vol. 333, pp. 855-858.
- Goodridge H.S.**, Marshall F.A. y Else K.J. (2005), "Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62", *J. Immunol.*, Vol. 174, pp. 284-293.
- Green M.R.**, Kennell A.S., Larche M.J., Seifert M.H., Isenberg D.A. y Salaman M.R. (2007), "Natural killer T cells in families of patients with systemic lupus erythematosus: their possible role in regulation of IgG production", *Arthritis Rheum.*, Vol. 56, pp. 303-310.
- Grossman W.J.**, Verbsky J.W., Tollefsen B.L., Kemper C., Atkinson J.P. y Ley T.J. (2004), "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells", *Blood*, Vol. 104:9, pp. 2840-2848.
- Groux et al.** (1997), "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis", *Nature*, Vol. 389, p. 737-742.
- Gruden-Movsesijan A.**, Ilic N. y Colic M. (2011), "The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells", *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, Vol. 34:5, pp. 429-439.
- Gruden-Movsesijan A.**, Ilic N., Mostarica-Stojkovic M., Stosic-Grujicic S., Milic M. y Sofronic-Milosavljevic L. (2010), "Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats", *Parasite Immunol.*, Vol. 32:6, pp. 450-459.
- Gutiérrez R.** y C. Cuéllar (2002), "Immunoglobulins anti-*Anisakis simplex* in patients with gastrointestinal diseases", *J. Helminthol.*, Vol. 76, pp. 131-136.
- Guzman M.P.**, Zhibin C. (2015), "Conversion of the CD8 lineage to CD4 T", *Oncotarget*, Vol. 6:25, pp. 20748-20749.
- Hamilton C.M.**, Dowling D.J., Loscher C.E., Morphew R.M., Brophy P.M. y O'Neill S.M. (2009), "The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function", *Infect. Immun.*, Vol. 77:6, pp. 2488-2498.
- Harnett W.**, Goodridge H.S., Harnett M.M. (2005), "Subversion of immune cell signal transduction pathways by the secreted filarial nematode product ES-62", *Parasitol.*, Vol. 130 Suppl, pp. 63-68.
- Harper H.M.**, Cochrane L. y Williams N.A. (1996), "The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance", *Immunol.*, Vol. 89:3, pp. 449-456.

- Hauf N.**, Goebel W., Fiedler F., Sokolovic Z. y Kuhn M. (1997), "*Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelAyp50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkBa and IkBb degradation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 9394-9399.
- Hayasaka H.**, Ishikura H., Mizukaki H., Uneno T., Utsumi A. y Saeki H. (1968), "Studies on anisakiosis VIII. Experimental studies on granuloma formation", *Jpn. Parasitol.*, Vol. 17, p. 261.
- Hayashi F.**, Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M. y Aderem A. (2001), "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5", *Nature*, Vol. 410, pp. 1099-1103.
- Hayday A.** y Tigelaar R. (2003), "Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 3:3, pp. 233-242.
- Hivroz C.**, Chemin K., Tourret M. y Bohineust A. (2012), "Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells", *Crit. Rev. Immunol.*, Vol. 32:2, pp. 139-155.
- Hochberg N.S.** y Hamer D.H. (2010), "*Anisakidosis*: Perils of the deep", *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 51:7, pp. 806-812.
- Højgaard D.** (1998), "Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae", *Sarsia*, Vol. 83, pp. 21-28.
- Holler E.**, Roncarolo M.G., Hintermeier-Knabe R., Eissner B., Ertl U., Schulz U., Knabe H., Kolb H.J., Andreesen R. y Wilmanns W. (2000), "Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation", *Bone Marrow Transplant*, Vol. 25, pp. 237-241.
- Hori S.** y Sakaguchi S. (2004), "Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells", *Microbes. Infect.*, Vol. 6, pp. 745-751.
- Hotchkiss R.S.**, Monneret G., Payen D. (2013), "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 13:12, pp. 862-874.
- Hotez P.**, Cappello M., Hawdon J., Beckers C. y Sakanari J. (1994), "Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: posible functions in the pathogenesis of human zoonoses", *J. Infect. Dis.*, Vol. 170, pp. 918-926.
- Huang W.** y Bussières J. (1988), "*Anisakids* and human anisakiosis", *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, Vol. 63:2, pp. 119-132.
- Hübner M.P.**, Shi Y., Torrero M.N., Mueller E., Larson D., Soloviova K., Gondorf F., Hoerauf A., Killoran K.E., Stocker J.T., Davies S.J., Tarbell K.V., Mitre E. (2012), "Helminth protection against autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice is independent of a type 2 immune shift and requires TGF- β ", *J. Immunol.* Vol. 188, pp. 559-568.
- Ibáñez Escribano S.** (2015), *Trichomonas vaginalis: corroboración experimental de modelos visuales de cribado farmacológico y caracterización biomolecular de aislados*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología.
- Iglesias R.**, Leiro J., Ubeira F., Santamarina M. y Sanmartín, M. (1993) "*Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice", *Parasite Immunol.*, Vol. 15, pp. 243-250.

- Ilic N.**, Colic M., Gruden-Movesesijan A., Majstorovic I., Vasilev S. y Sofronic-Milosavljevic L.J. (2008), "Characterization of rat bone marrow dendritic cells initially primed by *Trichinella spiralis* antigens", *Parasite Immunol.*, Vol. 30, pp. 491–495.
- Ilic N.**, Worthington J.J., Gruden-Movesesijan A., Travis M.A., Sofronic-Milosavljevic L.J. y Grecis R.K. (2011), "Trichinella spiralis antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3+ T cells *in vitro*", *Parasite Immunol.*, Vol. 33:10, pp. 572–582.
- Imai S.** y Fujita K., (2004), "Molecules of parasites as immunomodulatory drugs", *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol. 4:5, pp. 539–552.
- Ishikura H.**, Kikuchi K., Nagasawa K., Ooiwa T., Takamiya H., Sato N. y Sugane K. (1993), "Anisakidae and anisakidosis", en T. Sun (Ed), *Progress in Clinical Parasitology*. Vol. III, New York, Springer-Verlag.
- Ishikura H.** (1969), "On anisakiosis, its occurrence and clinical observation", *Nippon Rinsho Geka Igaku*, Vol. 30, p. 85.
- Iwasaki K.** y Torisu M. (1982), "Anisakis and eosinophil. II. Eosinophilic phlegmon experimentally induced in normal rabbits by parasites-derived eosinophil chemotactic factor (ECF-P)", *Clin. Immunol. Immunopathol.*, Vol. 23, pp. 593–605.
- Jackson J.A.**, Friberg I.M., Little S. y Bradley J.E. (2009), "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies?", *Immunol.*, Vol. 126, pp. 18–27.
- Jameson J.** y Havran W.L. (2007), "Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing", *Immuno. Rev.*, Vol. 215, pp. 114–122.
- Jankovic D.**, Steinfeld S., Kullberg M.C. y Sher A. (2006), "Mechanisms underlying helminth-induced Th2 polarization: default, negative or positive pathways?", *Chem. Immunol. Allergy*, Vol. 90, pp. 65–81.
- Jeannin P.**, Lecoanet S., Delneste Y., Gauchat J.F. y Bonnefoy J.Y. (1998), "IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10", *J. Immunol.*, Vol. 160, pp. 3555–3561.
- Jiang H.**, Chess L. (2000), "The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1", *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 18, pp. 185–216.
- Jiang H. et al.** (1995), "Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule", *Immunity*, Vol. 2:2, pp. 185–194.
- Jones R.E.**, Deardorff T.L. y Kayes S.G., "Anisakis simplex: histopathological changes in experimentally infected CBA/J mice", *Exp. Parasitol.*, Vol. 70:3, pp. 305–313.
- Kabelitz D.** (2011), "γδ T cells: cross-talk between innate and adaptive immunity", *Cell. Mol. Life Sci.*, Vol. 68, pp. 2331–2333.
- Kabelitz D.**, Marischen L., Oberg H.H., Holtmeier W. y Wesch, D. (2005), "Epithelial defence by gamma delta T cells", *Int. Arch. Allergy Immunol.*, Vol. 37, pp. 73–81.
- Kane C.M.**, Cervi L., Sun J., McKee A.S., Masek K.S., Shapira S., Hunter C.A. y Pearce E.J. (2004), "Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation", *J. Immunol.*, Vol. 173:12, pp. 7454–7461.
- Kapsenberg M.L.** (2003), "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization," *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 3:12, pp. 984–993.

- Karl, H.** (2008), "Nematode larvae in fish on the German market-20 years of consumer related research", *Arch. Lebensmittelhyg.*, Vol. 59, pp. 107-116.
- Karl H.,** Baumann F., Kuhn T. y Klimpel S. (2011), "*Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh", *Dis. Aquat. Org.*, Vol. 94, pp. 201-209.
- Kasper L.H.** y Shoemaker J. (2010), "Multiple sclerosisimmunology: the healthy immune system vs the MS immune system", *Neurol*, Vol. 74 Suppl. 1, pp. 2-8.
- Kasuya S.,** Hamano H. e Izumi S. (1990), "Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*", *Lancet*, Vol. 335, p. 665.
- Kayama H.,** Ueda Y., Sawa Y., Jeon S.G., Ma J.S. y Okumura R. (2012), "Intestinal CX3C chemokine receptor 1(high) (CX3CR1(high)) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 109, pp. 5010-5015.
- Kennedy S.** (2000), "Immune response to *Anisakis simplex* and other ascarid nematodes", *Allergy*, Vol. 55, p. 7.
- Khan W.I.,** Blennerhasset P.A., Varghese A.K., Chowdhury S.K., Omsted P., Deng Y. y Collins S.M. (2002), "Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice", *Infect Immun.*, Vol. 70:11, pp. 5931-5937.
- Khan A.R.** y Fallon P.G. (2013), "Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 43:3-4, pp. 293-299.
- Killick K.E.,** Cheallagh C.N., O'Farrelly C., Hokamp K., Machugh D.E., Hokamp y Harris J. (2013), "Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens," *Cell. Microbiol.*, Vol. 15:9, pp. 1484-1495.
- Kim S.,** Park M.K. y Yu H.S. (2015), "Toll-Like Receptor Gene Expression during *Trichinella spiralis* Infection", *Korean J. Parasitol.*, Vol. 53:4, pp. 431-438.
- Kirstein F.,** Nieuwenhuizen N., Worsnell G., Brombacher F., Mattiucci S. y Lopata A. (2007), "Different routes of sensitization to *Anisakis pegreffii* in a mouse model of allergic asthma", *Parassitologia*, Vol. 49:2, p. 222.
- Kitani A.,** Chua K., Nakamura K., Strober W. (2000), "Activated self-MHC reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells", *J. Immunol.*, Vol. 165, pp. 691-702.
- Van der Kleij D.,** Latz E. y Brouwers J.F. (2002), "A novel host-parasite lipid cross-talk Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization", *J. Biol. Chem.*, Vol. 277.
- Kobayashi A.,** Tsuji M., Wilbur D.L. (1985), "Probable pulmonary *Anisakis* accompanying pleural effusion", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 34, pp. 310-313.
- Kobayashi Y.,** Ishizaki S., Shimakura K., Nagashima Y. y Shiomi K. (2007), "Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*", *Parasitol Res.*, Vol. 100, pp. 1233-1241.
- Kobayashi Y.,** Kakemoto S., Shimakura K. y Shiomi K. (2015), "Molecular cloning and expression of a new major allergen, Ani s 14, from *Anisakis simplex*", *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, Vol. 56, pp. 194-199.
- Kobayashi Y.,** Ohsaki K., Ikeda K., Kakemoto S., Ishizaki S., Shimakura K., Nagashima Y. y Shiomi K. (2011), "Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library", *Parasitol. Int.*, Vol. 60, pp. 144-150.
- Kobayashi Y.,** Shimakura K., Ishizaki S., Nagashima Y. y Shiomi K. (2007), "Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*", *Mol. Biochem. Parasitol.*, Vol. 155, pp. 138-145.

- Køie M.**, Berland B. y Burt M. (1995), "Development to third-stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae)", *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, Vol. 52 Suppl 1, pp. 134-139.
- Kojima K.**, Koyanagi T. y Shiraki K. (1966), "Pathological studies of anisakiosis (parasitic abscess formation in gastrointestinal tract)", *Jpn. J. Clin. Med.*, Vol. 24, p. 134.
- Koyama K.** (2002), "NK1.1+ cell depletion *in vivo* fails to prevent protection against infection with the murine nematode parasite *Trichuris muris*", *Parasite Immunol.*, Vol. 24, pp. 527-533.
- Kronenberg M.** (2005), "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes", *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 23, pp. 877-900.
- Kuipers F.C.** (1964), "Eosinophilic phlegmonous inflammation of the alimentary canal caused by a parasite from the herring", *Pathol. Microbiol.*, Vol. 27, pp. 925-930.
- Kurniawan A.**, Yazdanbakhsh M., van Ree R., Aalberse R., Selkirk M.E. y Partono F. (1992), "Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis", *J. Immunol.*, Vol. 150, pp. 3941-3950.
- Layland L.E.**, Straubinger K., Ritter M., Loffredo-Verde E., Garn H., Sparwasser T. y Prazeres da Costa C. (2013), "Schistosoma mansoni-mediated suppression of allergic airway inflammation requires patency and Foxp3+ Treg cells", *PLoS Negl. Trop. Dis.*, Vol. 7, p. 2379.
- Lee J.S.**, Kim B.S. y Kim S.H. (2014), "Acute invasive small-bowel Anisakiosis: clinical and CT findings in 19 patients", *Abdom. Imaging.*, Vol. 39, p. 452.
- León B.**, López-Bravo M., Ardavín C. (2005), "Monocyte-derived dendritic cells", *Semin. Immunol.*, Vol. 17:4, pp. 313-318, Review.
- Levy M.M.**, Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L. y Ramsay G. (2003), "SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference", *Crit. Care Med.*, Vol. 31, pp. 1250-1256.
- De Ley P.** (2006), "A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny", en The *C. elegans* Research Community.
- Li J. et al.** (2001), "Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E", *J. Immunol.*, Vol. 167:7, pp. 3800-3808.
- Li Y.**, Chu N., Rostami A. y Zhang G.X. (2006), "Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation *in vitro* and *in vivo*", *J. Immunol.*, Vol. 177:3, pp. 1679-1688.
- Liacouras C.A.**, Bell L.M., Aljabi M.C. y Piccoli D.A. (1993), "*Angiostrongylus costaricensis* mimics Crohn's disease", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, Vol. 16, pp. 203-207.
- Limaye A.P.**, Kirby K.A., Rubenfeld G.D., Leisenring W.M., Bulger E.M., Neff M.J., Gibran N.S., Huang M.L., Santo Hayes T.K., Corey L. y Boeckh M. (2008), "Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients", *JAMA*, Vol. 300, pp. 413-422.
- Lio W.C.** y Hsieh C.S. (2008), "A two step process for thymic regulatory T cell development", *Immunity*, Vol. 28, pp. 100-111.
- Liu J.**, Cao X. (2015), "Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review", *J. Autoim.*, Vol. 63, pp. 1-12.

London D. y Hruschka D. (2014), "Helminths and human ancestral immune ecology: What is the evidence for high helminth loads among foragers?", *Am. J. Hum. Biol.*, Vol. 26:2, pp. 124-129.

López I. y Pardo M.A. (2010), "Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products", *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 58, pp. 1469-1477.

López-Serrano M.C., Gomez A.A. y Daschner A. (2000), "Gastroallergic anisakiosis: findings in 22 patients", *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Vol. 15, p. 503.

Loreille O. y Bouchet F. (2003), "Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 98, pp. 39-46.

Lorenzo S., Iglesias R. y Audicana M.T. (1999), "Human immunoglobulin isotype profiles produced in response to antigens recognized by monoclonal antibodies specific to *Anisakis simplex*", *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 29, p. 1095.

Lui J.B., McGinn S.L. y Chen Z. (2016), "Gut microbiota amplifies host-intrinsic conversion from the CD8 T cell lineage to CD4 T cells for induction of mucosal immune tolerance", *Gut Microbes*, Vol. 7:1, 40-47.

Luyt C.E., Combes A., Deback C., Aubriot-Lorton M.H., Nieszkowska A., Trouillet J.L., Capron F., Agut H., Gibert C. y Chastre J. (2007), "Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 175, pp. 935-942.

Ma X., Yan W. y Zheng H. (2015), "Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells", *F1000Res.*, Vol. 4, p. 1465.

MacDonald A.S., Maizels R.M. (2008), "Alarming dendritic cells for Th2 induction", *J. Exp. Med.*, Vol. 205:1, pp. 13-17.

Maizels R.M. (2016), "Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders", *Clin. Microbiol. Infect.*, Vol. 22, p. 6.

Maizels R.M., Balic A., Gómez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D. y Allen J.E. (2004), "Helminth parasites—masters of regulation", *Immunol. Rev.*, Vol. 201, pp. 89-116.

Maizels R.M. y McSorley H.J. (2016), "Regulation of the host immune system by helminth parasites", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 138:3, pp. 666-675.

Maizels R.M. y Yazdanbakhsh M. (2003), "Regulation of the immune response by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 3, pp. 733-43.

Manicassamy S. y Pulendran B. (2011), "Dendritic cell control of tolerogenic responses", *Immunol. Rev.*, Vol. 241, pp. 206-227.

Mantis N.J., Rol N. y Corthesy B. (2011), "Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut", *Mucosal Immunol.*, Vol. 4, pp. 603-611.

Martín et al. (2002), "Demostración de la existencia en la mucosa intestinal de DCs similares a las plasmacitoides e inductoras de Tregs", *Blood*, Vol. 100, p. 383.

Martins K.A., Bavari S., Salazar A.M. (2014), "Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives", *Expert Rev. Vaccines*, Vol. 14:3, pp. 447-459.

Matsui T., Iida M. y Murakami M. (1985), "Intestinal anisakiosis: clinical and radiologic features", *Radiol.*, Vol. 157, p. 299.

- Matthews B.E.** (1982), "Behaviour and enzyme release by *Anisakis* sp. Larvae", *J. Helminthol.*, Vol. 56, pp. 177-183.
- Mattiucci S.**, Abaunza P., Ramadori L. y Nascetti G. (2004), "Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition", *J. Fish. Biol.*, Vol. 65, pp. 495-510.
- Mattiucci S.**, Cianchi R., Nascetti G., Paggi L., Sardella N., Timi J., Webb S., Bastida R., Rodriguez D. y Bullini L. (2003), "Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of Boreal and Austral regions", *Syst. Parasitol.*, Vol. 54, pp. 13-23.
- Mattiucci S.**, Farina V., Campbell N., MacKenzie K., Ramos P., Pinto A., Abaunza P. y Nascetti G. (2008), "*Anisakis* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization", *Fish. Res.*, Vol. 89, pp. 146-151.
- Mattiucci S.** y Nascetti G. (2006), "Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update", *Parasite*, Vol. 13, pp. 99-113.
- Mattiucci S.** y Nascetti G. (2008), "Advances and trends in the molecular systematics of *Anisakis* nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite coevolutionary processes", *Adv. Parasitol.*, Vol. 66, pp. 47-148.
- Mattiucci S.**, Nascetti G., Bullini L., Orecchia P. y Paggi L. (1986), "Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae)", *J. Parasitol.*, Vol. 93, pp. 383-387.
- Mattiucci S.**, Paoletti M. y Webb S. (2009), "*Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data", *Syst. Parasitol.*, Vol. 74, pp. 199-217.
- McInnes I.B.**, Leung B.P., Harnett M., Gracie J.A., Liew F.Y. y Harnett W. (2003), "A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62", *J. Immunol.*, Vol. 171:4, pp. 2127-2133.
- McKay D.M.** (2006), "The beneficial helminth parasite?", *Parasitology*, Vol. 132:1, pp. 1-12.
- Meléndez A.J.**, Harnett M.M., Pushparaj P.N., Wong W.S., Tay H.K., McSharry C.P. y Harnett W. (2007), "Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes", *Nat. Med.*, Vol. 13:11, pp. 1375-1381.
- Meybehm M.**, Dworak O., Gugler R. (1989), "Granulomatous colitis with pseudopolyp in schistosomiasis", *Dtsch. Med. Wochenschr.*, Vol. 114, pp. 19-22.
- Miyara M.** y Sakaguchi S. (2007), "Natural Regulatory T cells: mechanisms of suppression", *Trends. Mol. Med.*, Vol. 13, Vol. 108-116.
- Mills C.D.** (2000), "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm", *J. Immunol.*, Vol. 164, pp. 6166-6173.
- Millers A.**, Lider O., Roberts A.B., Sporn M.B., Weiner H.L. (1992), "Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering", *Proc. Natl. Acad. Scid. USA*, Vol. 89, pp. 421-425.

Ministerios de Agricultura, Pesca y Alimentación. Centro Técnico Nacional de Conservación de productos de pesca y la acuicultura (CECOPESCA) (2012), *Guía sobre los principales parásitos presentes en productos pesqueros: técnicas de estudio e identificación*.

Mizel S.B., Honko A.N., Moors M.A., Smith P.S. y West A.P. (2003), "Induction of Macrophage Nitric Oxide Production by Gram-Negative Flagellin Involves Signaling Via Heteromeric Toll-Like Receptor 5/Toll-Like Receptor 4 Complexes", *J. Immunol.*, Vol. 170:12, pp. 6217-6223.

Möller H. y Anders K. (1986), *Diseases and parasites of marine fishes*, Kiel, Verlag Möller.

Moneo I., Caballero M.L., Gómez F., Ortega E. y Alonso M.J. (2000), "Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 106, pp. 177-182.

Montalto M., Miele L., Marcheggiano A., Santoro L., Curigliano V., Vastola M. y Gasbarrini G. (2005), "*Anisakis* infestation: a case of acute abdomen mimicking Crohn's disease and eosinophilic gastroenteritis", *Dig. Liver Dis.*, Vol. 37:1, pp. 62-64.

Montoro A., Perteguer M.J., Chivato T., Laguna R. y Cuéllar C. (1997), "Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*", *Allergy*, Vol. 52, pp. 985-991.

Moore D.A., Girdwood R.W. y Chiodini P.L. (2002), "Treatment of anisakiosis with albendazole", *Lancet*, Vol. 360, p. 54.

Moore M.A. y Tsuda H. (1998), "Chronically elevated proliferation as a risk factor for neoplasia", *Eur. J. Cancer Prev.*, Vol. 7, pp. 353-385.

Morris S.R. y Sakanari J.A. (1994), "Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*", *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, pp. 27650-27656.

Mossali C., Palermo S., Capra E., Piccolo G., Botti S., Bandi C., D'Amelio S., Giuffra E. (2010), "Sensitive detection and quantification of Anisakid parasite residues in food products", *Foodborne Pathog. Dis.*, Vol. 7, pp. 391-397.

Muthana M., Fairburn B., Mirza S., Slack L.K., Hopkinson K. y Pockley A.G. (2006), "Identification of a rat bonemarrow-derived dendritic cell population which secretes both IL-10 and IL-12: evidence against a reciprocal relationship between IL-10 and IL-12 secretion", *Immunobiol.*, Vol. 211:5, pp. 391-402.

Najafian N. et al. (2003), "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model", *J. Clin. Invest.*, Vol. 112:7, pp. 1037-1048.

De Nardo D. (2015), "Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation", *Cytokine*, Vol. 74, pp. 181-189.

Nascimento Santos L., Carvalho Pacheco L.G., Silva Pinheiro C. y Alcántara-Neves N.M. (2017), "Recombinant proteins of helminths with immunoregulatory properties and their possible therapeutic use", *Acta Tropica*, Vol. 166, pp. 202-211.

Nawa Y., Hatz C. y Blum J. (2005), "Sushi delights and parasites: the risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia", *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 41, p. 1297.

Nguyen T.T., Qasim M.A., Morris S., Lu C.C., Hill D. y Laskowski J.M. (1999), "Expression and characterization of elastase inhibitors from the ascarid nematodes *Anisakis simplex* and *Ascaris suum*", *Mol. Biochem. Parasitol.*, Vol. 30:102, pp. 79-89.

De Nicola P., Napolitano L., Di Bartolomeo N., Waku M., Innocenti P. (2005), "Anisakiosis presenting as perforated ulcer of the cecum", *G. Chir.*, Vol. 26, pp. 375-377.

- Niess J.H.**, Adler G. (2010), "Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions", *J. Immunol.*, Vol. 184, pp. 2026-2037.
- Nieuwenhuizen N.**, Herbert D.R., Brombacher F. y Lopata A.L. (2009), "Differential requirements for interleukin (IL)-4 and IL-13 in protein contact dermatitis induced by *Anisakis*", *Allergy*, Vol. 64:9, pp. 1309-1318.
- Nieuwenhuizen N.**, Lopata A.L., Jeebhay M.F., Herbert D.R., Robins T.G. y Brombacher F. (2006), "Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 117, pp. 1098-1105.
- Nutman T.B.** (2015), "Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths", *Parasite Immunol.*, Vol. 37, pp. 304-313.
- O'Brien J.**, Wilson I., Orton T. y Pognan F. (2000), "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity", *Eur. J. Biochem*, Vol. 267, pp. 5421-5426.
- Olivares Ponce F.O.** (2013), "Efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de *Anisakis* al aplicar tratamientos selectivos en el pescado parasitado", Tesis Doctoral, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, UCM.
- Osanz Mur A.** (2001), *Presencia de larvas de anasákidos (Nematoda: Ascaroidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona*, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria.
- Oshima, T.** (1972), "*Anisakis* and anisakiosis in Japan and adjacent area", en K. Morishita, Y. Komiya y H. Matsubayashi (Eds.). *Progress of Medical Parasitology in Japan*, Vol. IV, Tokio, Meguro Parasitological Museum, pp. 301-393.
- Oshiro T.M.**, Macedo M.S. y Macedo-Soares M.F. (2005), "Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suu*", *Inflamm. Res.*, Vol. 54, pp. 17-21.
- Ospelt C.** y Gay S. (2010), "TLR and chronic inflammation", *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, Vol. 42, pp. 495-505.
- Otto G.P.**, Sossdorf M. y Claus R.A. (2011), "The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate", *Crit. Care*, Vol. 15, p. 183.
- Pacios E.**, Arias-Díaz J. y Zuloaga J. (2005), "Ibendazole for the treatment of anisakiosis ileus", *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 41, p. 1825.
- Pardo-Gandarillas M.**, Lohrmann K., Valdivia A. e Ibáñez C. (2009), "First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d' Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile", *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, Vol. 44:2, pp. 397-408.
- Park M.S.**, Kim K.W., Ha H.K. y Lee D.H. (2008), "Intestinal parasitic infection", *Abdom Imaging*, Vol. 33, p. 166.
- Park S.K.**, Cho M.K., Park H.K., Lee K.H., Lee S.J., Choi S.H., Ock M.S., Jeong H.J., Lee M.H. y Yu H.S. (2009), "Macrophage Migration Inhibitory Factor Homologs of *Anisakis simplex* Suppress Th2 Response in Allergic Airway Inflammation Model via CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cell Recruitment", *J. Immunol.*, Vol. 182:11, pp. 6907-6914.
- Pereira Bueno, J.** (1992), *Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis*, Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social, Dirección General de Salud Pública.

- Pérez-Pérez J.**, Fernández-Caldas E., Marañón F., Sastre J., Bernal M.L., Rodríguez J. y Bedate C.A. (2000), "Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*", *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, Vol. 123, pp. 120-129.
- Perrigoue J.G.**, Marshall F.A. y Artis D. (2008), "On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites", *Cell. Microbiol.*, Vol. 10, pp. 1757-1764.
- Perteguer M.J.** y Cuéllar C. (1998), "Isotype-specific immune responses in murine experimental anisakiosis", *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, Vol. 45:10, pp. 603-10.
- Perteguer M.J.** y Cuéllar C. (2001), "Interleukin-4 production in BALB/c mice immunized with *Anisakis simplex*", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 96, pp. 979-982.
- Perteguer M.J.**, Ortiz G., García E., Flores M., Rodríguez E., Ubeira F.M. y Gárate T. (2004), "Application of the PCR-RFLP technique for the species-specific identification of nematodes involved in human anisakiosis", *Med. Clin. (Barc)*, Vol. 122:18, pp. 686-689.
- Perteguer M.J.**, Raposo R. y Cuéllar C. (1996), "In vitro study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 26:1, pp. 105-108.
- Petithory J.C.**, Paugam B., Buyet-Rousset P. y Paugam A. (1990), "*Anisakis simplex*, a co-factor of gastric cancer?", *Lancet*, Vol. 336, p. 1002.
- Petrie A.**, Wootten R., Bruno D., MacKenzie K. y Bron J. (2007), *A survey of Anisakis and Pseudoterranova in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods*, FSAS.
- Pils M.C.**, Pisano F., Fasnacht N., Heinrich J.M., Groebe L., Schippers A., Rozell B., Jack R.S. y Müller W. (2010), "Monocytes/macrophages and/or neutrophils are the target of IL-10 in the LPS endotoxemia model", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 40, pp. 443-448.
- Platts-Mills T.A.**, Woodfolk J.A., Erwin E.A. y Aalberse R. (2004), "Mechanisms of tolerance to inhalant allergens: the relevance of a modified Th2 response to allergens from domestic animals", *Springer Semin. Immunopathol.*, Vol. 25, pp. 271-279.
- Poze M.**, Ramsay G., Gerlach H., Rubulotta F. y Levy M. (2004), "An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis", *Crit. Care*, Vol. 8, pp. 409-413.
- Del Pozo M.D.**, Moneo I. y de Corres L.F. (1996), "Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 97, p. 977.
- Prado Cueto C.** (2012), *Células T efectoras y reguladoras en Lupus Eritematosos Sistémico. Efecto de los corticoides sobre la expresión de Foxp3 y la producción de IL-17*, Tesis Doctoral, Departamento de Biología Funcional, Área de Inmunología, Universidad de Oviedo.
- Puente P.**, Anadón A.M., Rodero M., Romarís F., Ubeira F.M. y Cuéllar C. (2008), "*Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption", *Exp. Parasitol.*, Vol. 118, pp. 271-274.
- Pulendran B.**, Smith J.L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Maraskovsky E. y Maliszewski C.R. (1999), "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96:3, pp. 1036-1041.
- Qin G.**, Mao H., Zheng J., Sia S.F., Liu Y. y Chan P.L. (2009), "Phosphoantigen-expanded human gamma delta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses", *J. Infect. Dis.*, Vol. 200, pp. 858-865.

Quiazon K., Yoshinaga T. y Ogawa K. (2011), "Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu strict and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder", *Parasitol. Int.*, Vol. 60, pp. 126-131.

Ramos L., Alonso C. y Guilarte M. (2005), "*Anisakis simplex*-induced small bowel obstruction after fish ingestion: preliminary evidence for response to parenteral corticosteroids", *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, Vol. 3, p. 667.

Rampersad S.N. (2012), "Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. Review", *Sensors*, Vol. 12, pp. 12347-12360.

Raybourne R.B., Deardorff T.L. y Bier J.W. (1986), "*Anisakis simplex*: production dynamics of larval excretory-secretory proteins and their cytostatic action in mammalian cell cultures", *Exp. Parasitol.*, Vol. 62, pp. 92-97.

Raybourne R.B., Desowitz M., Klicks M. y Deardoff T.L (1983), "*Anisakis simplex* and *Terranova sp.*: inhibition by larval excretory-secretory products of mitogen-induced rodent lymphoblast proliferation", *Exp. Parasitol.*, Vol. 55, pp. 289-298.

REAL DECRETO 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.

REGLAMENTO (CE) N° 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

Repiso Ortega A., Alcántara Torres M., González de Frutos C., de Artaza Varasa T., Rodríguez Merlo R., Valle Muñoz J., Martínez Potenciano J.L. (2003), "Gastrointestinal anisakiosis. Study of a series of 25 patients", *Gastroenterol. Hepatol.*, Vol. 26:6, pp. 341-346.

Del Rey Moreno A., Valero A., Mayorga C., Gómez B., Torres M.J., Hernández J., Ortiz M. y Lozano Maldonado J. (2006), "Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population", *Acta Trop.*, Vol. 97:3, pp. 265-269.

Van Riet E., Hartgers F.C., Yazdanbakhsh M. (2007), "Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms", *Immunobiol.*, Vol. 212:6, pp. 475-490.

Rifa'i M. (2004), "Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis", *J. Exp. Med.*, Vol. 200:9, pp. 1123-34.

Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J. y Minor L. (2013-2016), *Cell viability assays. Assay Guidance Manual* (online).

Rodero M. (2002), *Anisakis simplex: purificación antigénica y desarrollo de nuevas técnicas de inmunodiagnóstico in vivo e in vitro*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología.

Rodríguez-Mahillo A.I., González-Muñoz M., de las Heras C., Tejada M. y Moneo I. (2010), "Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle", *Foodborne Pathog. Dis.*, Vol. 7, pp. 967-973.

Rodríguez-Mahillo A.I., González-Muñoz M., Gómez-Aguado F., Rodríguez-Pérez R., Corcuera M.T., Caballero M.L. y Moneo I. (2007), "Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen *Ani s 4* as a cysteine-protease inhibitor", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 37, pp. 907-917.

- Rodríguez-Mahillo A.I.**, González-Muñoz M., Moneo I., Solas M.T., Mendizábal A., de las Heras C. y Tejada M. (2008), "Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion", *J. Food Prot.*, Vol. 71, pp. 2578-2581.
- Rodríguez-Pérez R.**, Moneo I., Rodríguez-Mahillo A. y Caballero M.L. (2008), "Cloning and expression of *Ani s 9*, a new *Anisakis simplex* allergen", *Mol. Biochem. Parasitol.*, Vol. 159, pp. 92-97.
- Roepstorff A.**, Karl H., Bloemsma B. y Huss H. (1993), "Catch handling and possible migration of *Anisakis* larvae in herring (*Clupea harengus*)", *J. Food Protect.*, Vol. 56, pp. 783-787.
- Roncarolo M.G.** et al. (2001), "Type 1 T regulatory cells", *Immunol. Rev.*, Vol. 182, p. 68.
- Roncarolo M.G.**, Gregori S., Battaglia R., Bachetta R., Fleischhauer K. y Levings M.K. (2006), "Interleukin-10-secreting type 1 T regulatory cells in rodents and humans", *Immunol. Rev.*, Vol. 212, pp. 28-50.
- Rook G.A.** (2007), "The hygiene hypothesis and the increasing prevalence of chronic inflammatory disorders", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 101:11, pp. 1072-1074.
- Rook G.A.** (2009), "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis", *Immunol.*, Vol. 126:1, pp. 3-11.
- Ruitenbergh E.J.** (1971), "Experimental anisakiosis in rabbits", en S.M. Gaafar (Ed.), *Pathology of Parasitic Diseases*, Indiana, Purdue University Studies, pp. 359-366.
- Ruitenbergh E.J.** y Loendersloot H.J. (1971), "Histochemical properties of the excretory organ of *Anisakis* sp. Larva", *J. Parasitol.*, Vol. 57, pp. 1149-1150.
- Ruíz-Valero J.**, Valero A., Adroher F. y Ortega J. (1992), "Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada", en S. Hernández (Ed.), *En Memoria al profesor Doctor DF. de P. Martín Gómez Córdoba*, Universidad de Córdoba, pp. 335-349.
- Rushovich A.M.**, Randall E.L., Caprini J.A. y Westenfelder G.O. (1983), "Omental anisakiosis: a rare mimic of acute appendicitis", *Am. J. Clin. Pathol.*, Vol. 80, pp. 517-520.
- Sakaguchi S.** (2000), "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance", *Cell.*, Vol. 101, p. 455.
- Sakaguchi S.** (2001), "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells; their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance", *Immunol. Rev.*, Vol. 182, pp. 18-32.
- Sakaguchi S.**, Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M., (1995), "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-12 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases", *J. Immunol.*, Vol. 155, pp. 1151-1164.
- Sakanari J.A.** (1990), "*Anisakis*-from the platter to the microfuge", *Parasitol. Today*, Vol. 6, pp. 323-327.
- Sakanari** y McKerrow (1990), "Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*", *J. Parasitol.*, Vol. 76, p. 625.
- Sánchez-Velasco P.**, Mendizábal L., Antón E.M., Ocejo-Vinyals G., Jerez J. y Leyva-Cobián F. (2000), "Association of hypersensitivity to the nematode *Anisakis simplex* with HLA class II DRB1*1502-DQB1*0601 haplotype", *Hum. Immunol.*, Vol. 61:3, pp. 314-319.
- Santaolalla M.**, Moneo I., Pérez A., Curiel G., De Paz S. y Domínguez A.R. (1997), "Anisakidosis aguda de presentación familiar", *Rev. Esp. Allergol. Immunol. Clin.*, Vol. 7, pp. 302-305.

- Saraiva M.** (2005), "Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus", *J. Immunol.*, Vol. 175, pp. 1041-1046.
- Sastre J.**, Lluch-Bernal M., Quirce S., Arrieta I., Lahoz C., Del Amo A., Fernández- Caldas E. y Marañón F.A. (2000), "Double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*", *Allergy*, Vol. 55, pp. 560-564.
- Sattler S.**, Ling G.S., Xu D., Husaarts L., Romaine A., Zhao H. (2014), "IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (B_{reg}(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut", *J. Autoimmun.*, Vol. 50, pp. 107-122.
- De Savigny D.H.** y Tizard I.R. (1977), "Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 71:6, pp. 501-507.
- Schaerli O.**, Willmann K., Lang A.B., Lipp M., Loetscher P. y Moser B. (2000), "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helperfunction", *J. Exp. Med.*, Vol. 192:11, pp. 1553-1562.
- Schild H.**, Mavaddat N., Litzenberger C., Ehrlich E.W., Davis M.M. y Bluestone J.A. (1994), "The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T cells", *Cell*, Vol. 76, pp. 29-37.
- Schnare M.**, Barton G.M., Holt A.C., Takeda K., Akira S. y Medzhitov R. (2001), "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses", *Nat. Immunol.*, Vol. 2:10, pp. 947-50.
- Segura M.**, Su Z., Piccirillo C. y Stevenson M.M. (2007), "Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 37:7, pp. 1887-1904.
- Shakib F.**, Ghaemmaghami A.M., Sewell H.F. (2008), "The molecular basis of allergenicity", *Trends Immunol.*, Vol. 29, pp. 633-642.
- Shen P.**, Roch R., Lampropoulou V., O'Connor R.A., Stervbo U. y Hilgenberg E. (2014), "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases", *Nature*, Vol. 50, pp. 366-370.
- Shibata E.**, Ueda T., Akaike G. y Saida Y. (2014), "CT findings of gastric and intestinal anisakiosis", *Abdom. Imaging.*, Vol. 39, p. 257.
- Shibata O.**, Uchida Y. y Fursawa P. (1989), "Acute gastric anisakiosis with special analysis of the location of the worms penetrating the gastric mucosa", Gastric anisakiosis in Japan. Epidemiology, diagnosis, treatment. (Eds. Ishikura, H.; Namiki, M.), Tokyo, Springer-Verlag, pp. 53-57.
- Shiny C.**, Krushna N.S., Babu S., Elango S., Manokaran G. y Narayanan R.B. (2011), "Recombinant Wolbachia heat shock protein 60 (HSP60) mediated immuneresponses in patients with lymphatic filariasis", *Microbes Infect.*, Vol. 13, pp. 1221-1231.
- Shirahama M.**, Koga T., Uchida S., Miyamoto Y. y Ohta Y. (1990), "Colonic anisakiosis simulating carcinoma of the colon", *Am. J. Roentgenol.*, Vol. 155, p. 895.
- Silva, M.** y Eiras, J. (2003), "Occurrence of *Anisakis* sp. In fishes of the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential", *Bull. Eur. Fish. Pathol.*, Vol. 23, pp. 13-17.
- Simons F.E.** (2011), "Anaphylaxis pathogenesis and treatment", *Allergy*, Vol. 66 Suppl 95, pp. 31-34.
- Slack J.H.** (1987), "Strain-dependent IgG subclass response patterns", *J. Immunol.*, Vol 139:11, pp. 3734-3738.

- Smith J.** (1983), "*Anisakis simplex*. (Rudolphi, 1809, del Krabbe, 1878) (Nematoda: *Ascaroidea*): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology", *J. Helminthol.*, Vol. 57, pp. 205-224.
- Smith, J.** y Wootten, R. (1975), "Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. Larvae (Nematoda: *Ascaridida*) into the flesh of herring *Clupea harengus*", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 5, pp. 133-136.
- Smith, J.W.** y Wootten, R. (1978), "*Anisakis* and Anisakiosis", *Adv. Parasitol.*, Vol. 16, pp. 93-163.
- Smits H.H.**, Hammad H., van Nimwegen M., Soullie T., Willart M.A. y Lievers E. (2007), "Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic asthma depends on intensity and chronicity of infection", *J. Allergy Clin. Immunol.*, Vol. 120, pp. 932-940.
- Smits H.H.**, de Jong E.C., Wierenga E.A. y Kapsenberg M.L. (2005), "Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity", *Trends Immunol.*, Vol. 26:3, pp. 123-129.
- Sofronic-Milosavljevic L.**, Ilic N., Pinelli E. y Gruden-Movsesijan A. (2015), "Secretory Products of *Trichinella spiralis* Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies", *J. Immunol. Res.*
- Sprent J.F.A.** (1969), "Helminth zoonoses; an analysis", *Helminthol. Abs.*, Vol. 38, pp. 333-351.
- Stanton, T.H. et al.** (1978), "The Qa-1 antigenic system. Relation of Qa-1 phenotypes to lymphocyte sets, mitogen responses, and immune functions", *J. Exp. Med.*, Vol. 148:4, pp. 963-973.
- Steinman R.M.**, Hawiger D. y Nussenzweig M.C. (2003), "Tolerogenic dendritic cells", *Ann. Rev. Immunol.*, Vol. 21, pp. 685-711.
- Summers R.W.**, Elliott D.E., Qadir K., Urban J.F. Jr, Thompson R., Weinstock J.V. (2003), "*Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease", *Am. J. Gastroenterol.*, Vol. 98:9, pp. 2034-2041.
- Sun M.**, He C., Cong Y. y Liu Z. (2015) "Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota", *Mucosal Immunol.*, Vol. 8, pp. 969-978.
- Supali T.**, Verweij J.J., Wiria A.E., Djuardi Y., Hamid F., Kaisar M.M., Wammes L.J., van Lieshout L., Luty A.J., Sartono E. y Yazdanbakhsh M. (2010), "Polyparasitism and its impact on the immune system", *Int. J. Parasitol.*, Vol. 40, pp. 1171-1176.
- Suto A.**, Nakajima H., Ikeda K., Kubo S., Nakayama T., Taniguchi M., Saito Y., Iwamoto I. (2002), "CD4(+)CD25(+) T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms", *Blood*, Vol. 99, pp. 555-560.
- Suvas S.** y Rouse B.T. (2006), "Treg control of antimicrobial T cell responses", *Curr. Opin. Immunol.*, Vol. 18, p. 344.
- Taga K.**, Tosato G. (1992), "IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production", *J. Immunol.*, Vol. 148:4, pp. 1143-1148.
- Takabayashi T.**, Mochizuki T. y Otani N. (2014), "Anisakiosis presenting to the ED: clinical manifestations, time course, hematologic tests, computed tomographic findings, and treatment", *Am. J. Emerg. Med.*, Vol. 32, p. 1485.
- Takeda K.**, Kaisho T. y Akira S. (2003), "Toll-like receptors", *Ann. Rev. Immunol.*, Vol. 21, pp. 335-376.

- Tanaka J.** y Torisu T. (1978), "*Anisakis* and eosinophil. I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from *Anisakis* larvae", *J. Immunol.*, Vol. 120, pp. 745-749.
- Tanaka K.**, Kawamura H., Tohgi N., Tsuji M., Miyachi Y. y Miyoshi A. (1983), "The measurement of *Ascaris suum* protein by radioimmunoassay in sera from patients with helminthiasis and with gastrointestinal diseases", *Parasitol.*, Vol. 86:2, pp. 291-300.
- Tang Q.** y Bluestone A.J. (2006), "Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity", *Immunol. Rev.*, Vol. 212, p. 217.
- Taniguchi M.**, Harada M., Kojo S., Nakayama T. y Wakao H. (2003), "The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response", *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 21, pp. 483-513.
- Taylor, S.** (2006), "The nature of food allergy", en S. Koppelman y S. Hefle (Eds.), *Detecting allergens in food*, Cambridge, Publishing Ltd & CRC, pp. 3-20.
- Tejada, M.** (2009), "*Anisakis*: efecto de los tratamientos dados al pescado en las larvas y en sus alérgenos", *Alim. Nutri. Salud*, Vol. 16:3, pp. 71-83.
- Terabe M.** y Berzofsky J.A. (2014), "The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases", *Cancer Immunol. Immunother.*, Vol. 63:3, pp. 199-213.
- Thewissen, J.G.M.**, Cooper, L.N. y George, J.C. (2009), "From land to water: the origin of whales, dolphins, and porpoises", *Evo. Edu. Outreach*, Vol. 2, p. 272
- Van Thiel P.** (1960), "*Anisakis*", *Parasitol.*, Vol. 53, p. 16.
- Thomas P.G.**, Carter M.R., Dádara A.A., De Simone T.M. y Harn D.A. (2005), "A helminth glycan induces APC maturation via alternative NFkappa B activation independent of I kappa B alpha degradation", *J. Immunol.*, Vol. 175, p. 2082.
- Thornton A.M.**, Piccirillo C.A. y Shevach E.M. (2004), "Activation requirements for the induction of CD4+ CD25+ T cells suppression function", *Eur. J. Immunol.*, Vol. 34, pp. 366-376.
- Thornton A.M.** y Shevach E.M. (2000), "Suppressor effector function of CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific", *J. Immunol.*, Vol. 164, pp. 183-190.
- Torisu M.**, Iwasaki K., Tanaka J., Iino H. y Yshida T. (1981), "*Anisakis* and eosinophilic: pathogenesis and biologic significance of eosinophilic phlegmon in human anisakiosis. Immunology of the eosinophil", *Proc. 1st Symp. Japan*, pp. 343-366.
- Totsuka M.** (1974), "Human anisakiosis. III. Epidemiology", en Japanese Society Science Fisheries (Ed.), *Fish and Anisakis*, Tokyo, Koseisha-Koseikaku, pp. 44-57.
- Tsukada J.**, Ozaki A., Hanada T., Chinen T., Abe R., Yoshimura A. y Kubo M. (2005), "The role of suppressor of cytokine signaling 1 as a negative regulator for aberrant expansion of CD8alpha+ dendritic cell subset", *Int. Immunol.*, Vol. 17:9, pp. 1167-1178.
- Tsuji M.**, Mombaerts P., Lefrancois L., Nussenzweig R.S., Zavala F., Tonegawa S. (1994), "Gamma delta T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in alpha beta T-cell-deficient mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp. 345-349.
- Tupin E.**, Kinjo Y. y Kronenberg M. (2007), "The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms", *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 5, pp. 405-417.
- Vadasz Z.**, Haj T., Kessel A. y Toubi E. (2013), "B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation", *FEBS Lett*, Vol. 587, pp. 2074-2078.

- Valdivieso E.**, Perteguer M.J., Hurtado C., Campioli P., Rodríguez E., Saborido A., Martínez-Fernández V., Gómez-Puertas P., Ubeira F.L. y Gárate T. (2015), "ANISERP: a new serpin from the parasite *Anisakis simplex*", *Parasites & Vectors*, Vol. 8, p. 399.
- Varol C.**, Vallon-Eberhard A., Elinav E., Aychek T., Shapira Y. y Luche H. (2009), "Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions", *Immunity*, Vol. 31, pp. 502-512.
- Valero López A.**, Adroher Auroux F. y Rello Yubero F. (2004), "Anisákidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública", *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, Vol. 17, pp. 173-197.
- Valiñas B.**, Lorenzo S., Eiras A., Figueiras A., Sanmartín M.L. y Ubeira F.M. (2001), "Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population", *Allergy*, Vol. 56:7, pp. 667-671.
- Valls A.**, Pascual C. y Martín Esteban M. (2005), "*Anisakis* allergy: an update", *Rev. Fran. Allergol. Immunog. Clin.*, Vol. 45, pp. 108-113.
- Valls A.**, Pascual C. y Martín Esteban M. (2003), "*Anisakis* and anisakiosis", *Allergol. Immunopathol.*, Vol. 31, pp. 348-355.
- Vanbuskirk A.M.**, Burlingham W.J., Jankowska-Gan E., Chin T., Kusaka S., Geisseler F., Pelletier R.P., Orosz C.G. (2000), "Human allograft acceptance is associated with immune regulation", *J. Clin. Invest.*, Vol. 106, pp. 145-155.
- Vanhoutte F.**, Breuilh L. y Fontaine J. (2007), "Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology", *Microbes. Infect.*, Vol. 9, p. 1606.
- Viciano Martínez-Lage M.J.**, Cabezas Fernández M.T., Fuentes Porcel O., Jiménez Cortés M.C., Latorre Navarro E. y Avivar Oyonarte C. (2001), "Ileitis segmentaria secundaria a *Anisakis*", *Rev. Esp. Patol.*, Vol. 34:2, pp. 135-139.
- Vidacek S.**, de las Heras C., Solas M.T., Mendizábal A., Rodríguez-Mahillo A.I. y Tejada M. (2010), "Antigenicity and viability of *Anisakis larvae* infesting hake heated at different time-temperature conditions", *J. Food Prot.*, Vol. 73, pp. 62-68.
- Vlad G.**, Cortesini R. y Suciu-Foca N. (2005), "License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC", *J. Immunol.*, Vol. 174:10, pp. 5907-5914.
- Waldmann H.**, Adams E., Fairchild P. y Cobbold S. (2006), "Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue", *Immunol. Rev.*, Vol. 212, p. 301.
- Wammes L.J.**, Wiria A.E., Toenhake C.G., Hamid F., Liu K.Y., Suryani H., Kaiser M.M., Verweij J.J., Sartono E., Supali T., Smits H.H., Luty A.J. y Yazdanbakhsh M. (2013), "Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses", *J. Infect. Dis.*, Vol. 207:10, pp. 1590-1599.
- Wands J.M.**, Roark C.L., Aydinoglu M.K., Jin N., Hahn Y.S. y Cook L. (2005), "Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung", *J. Leukoc. Biol.*, Vol. 78, pp. 1086-1096.
- Watanabe H.** (2004), "Innate immune response in Th1 and Th2 dominant mouse strains", *Shock*, Vol. 22:5, pp. 460-466.
- Waye J.D.** y Hunt R.H. (1982), "Colonoscopic diagnosis of inflammatory bowel disease", *Surg. Clin. North. Am.*, Vol. 62, pp. 905-913.

- Wei S. et al.** (2005) "Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma", *Cancer Res.*, Vol. 65:12, pp. 5020-5026.
- Weiner** (2001), "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells", *Immunol. Rev.*, Vol. 182, p. 207.
- Weinstock J.V.**, Summers R.W., Elliott D.E. (2005), "Role of helminths in regulating mucosal inflammation", *Springer Semin. Immunopathol.*, Vol. 27:2, pp. 249-271.
- White R.R.** y Artanavis Tsakonas K. (2012), "How helminths use excretory-secretory fractions to modulate dendritic cells", *Virulence*, Vol. 3:7, pp. 668-677.
- Xia C.Q.** y Kao K.J. (2003), "Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase", *Scan. J. Immunol.*, Vol. 58:1, pp. 23-32.
- Xu J.**, Zhang H C.L., Zhang D., Ji M., Wu H. y Wu G. (2014a), "Schistosoma japonicum infection induces macrophage polarization", *J Biomed. Res.*, Vol. 28, pp. 299-308.
- Xu X.**, Gao X., Zhao X., Liao Y., Ji W., Li Q. y Li J. (2016), "PU.1-silenced dendritic cells induce mixed chimerism and alleviate intestinal transplant rejection in rats via a Th1 to Th2 shift", *Cell. Physiol. Biochem.*, Vol. 38, pp. 220-228.
- Xu X.R.**, Liu C.Q., Feng B.S. y Liu Z.J. (2014b), "Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease", *World J. Gastroenterol.*, Vol. 20, pp. 3255-3264.
- Yazdanbakhsh M.**, Kreamsner P. y van Ree R. (2002), "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis", *Science*, Vol. 296, pp. 490-494.
- Yokogawa M.** y Yoshimura H. (1967), "Clinicopathologic studies on larvae *Anisakis* in Japan", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 16, pp. 723-728.
- Yoshimoto T.**, Bendelac A., Watson C., Hu-Li J. y Paul W.E. (1995), "Role of NK1.1⁺ T cells in a Th2 response and in IgE production", *Science*, Vol. 270, pp. 1845-1847.
- Yoshimura H.**, Kondo K., Akao N., Ohnishi Y., Watanabe K., Shinno B. y Aikawa K. (1979), "Two cases of eosinophilic granulomas formed in the large omentum and mesentery by the penetrated *Anisakis* larva through the gastrointestinal tract", *To. Cho. Stom. Intest.*, Vol. 14, pp. 519-522.
- Zaccone P.**, Fehervari Z., Phillips J.M., Dunne D.W. y Cooke A. (2006), "Parasitic worms and inflammatory diseases", *Parasite Immunol.*, Vol. 28:10, pp. 515-523.
- Zamora V.**, García-Ballesteros C., Benet-Campos C., Ballester F., Cuéllar C. y Andreu-Ballester J.C. (2017), "Anti-*Anisakis* sp. antibodies in serum of healthy subjects. Relationship with ab and gd T cells", *Acta Parasitol.*, Vol. 62:1, pp. 97-103.
- Zeni O.**, Sannino A., Romeo S., Micciulla F., Bellucci S., Scarfi M.R. (2015), "Growth inhibition, cell-cycle alteration and apoptosis in stimulated human peripheral blood lymphocytes by multiwalled carbon nanotube buckypaper", *Nanomedicine (Lond.)*, Vol. 10:3, pp. 351-360.
- Zhang X.**, Edwards J.P. y Mosser D.M. (2006), "Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription", *J. Immunol.*, Vol. 177, pp. 1282-1288.
- Zheng J.**, Liu Y., Lau Y.L. y Tu W. (2013), "γδ T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity", *Cell. Mol. Immunol.*, Vol. 411, pp. 820-824.

IX. Bibliografía

Zheng S.G., Gray J.D., Ohtsuka K., Yamagiwa S. y Horwitz D.A. (2002), "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors", *J. Immunol.*, Vol. 169:8, pp. 4183-4189.

Zohar I., Biton R. (2011), "Land, lake, and fish: Investigation of fish remains from Gesher Benot Ya'aqov (paleo-Lake Hula)", *J. Hum. Evol.*, Vol. 60, pp. 343-356.

Zugarramurdi A., Parín M.A. y Lupin H.M. (1998), *Ingeniería Económica Aplicada a la Industria Pesquera*, Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1998.

X.LISTADO DE FIGURAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Larvas de *Anisakis simplex*.

Figura 2. Morfología de *Anisakis simplex* detallada. Extremos anterior y posterior (Otilia Olivares, 2013).

Figura 3. Esquema del ciclo biológico de los anisákidos.

Figura 4. Distribución mundial de *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens* (Hochberg y Hamer, 2010).

Figura 5. Larvas de *Anisakis simplex* en Merluza (*M. merluccius*) y en manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Olivares Ponce, 2013).

Figura 6. Anisakidosis humana (Sakanari, 1990; Daschner et al., 2000)

Figura 7. *Anisakis simplex*, vivo, inactivado, o sus alérgenos. (A) Sensibilización primaria. (B) Anisakiosis gástrica y gastroalérgica. (C) Tolerancia. (D) Urticaria crónica por sensibilización a *A. simplex*. Abreviaturas: AG, anisakiosis gástrica; AGA, anisakiosis gastroalérgica; ES, productos de excreción-secreción; Ag, antígenos de *A. simplex*; FcεRI, receptor de alta afinidad por IgE; SPT+, SPT positivo; Treg, células T reguladoras; UC+, urticaria crónica por sensibilización a *A. simplex* (Daschner et al., 2012).

Figura 8. Subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ de origen central (timo) en función del microambiente de citocinas en el que se activen. Modificado a partir de Prado Cueto, 2012.

Figura 9. Estructura de los receptores humanos TCR-γδ y TCR-αβ (Allison et al., 2001).

Figura 10. Muestra el paradigma de la Hipótesis de la Higiene. Las respuestas responsables del desequilibrio que puede llevar a la autoinmunidad serían principalmente Th1 y Th17, a través de CDs, macrófagos y citocinas proinflamatorias. Mientras que, en individuos alérgicos (atópicos), predominaría una respuesta de carácter Th2, con carencia de células tipo Th1 y una reducción en las células reguladoras (Treg). La secreción de IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13 estimularía la producción de IgE, eosinofilia y aumento en el número de mastocitos y basófilos. El empleo de los helmintos como estrategia terapéutica podría devolver el equilibrio homeostático entre las respuestas Th1/Th17 (autoinmunidad) y Th2 (alergia) a través de la inducción de un ambiente inmunorregulador, en presencia de citocinas que favorecen la reparación celular, como TGF-β y la IL-10. Modificado de Khan y Fallon (2013).

Figura 11. Resumen de las vías de señalización activadas por los TLR. Los ligandos procedentes de patógenos son reconocidos por su TLR específico correspondiente (situado en la membrana plasmática, o intracelularmente en la membrana endosomal) y comienza la señal intracelular. Con la excepción de TLR3, todos los TLR activarán la vía dependiente de Myd88. Este, a su vez, reclutará proteínas de la familia IRAK con la ayuda de la proteína TRAF6. Las proteínas IRAK son fosforiladas y pasan la señal al complejo TAK1, que activa el complejo IKK. Este último fosforila IκB, provocando su degradación y la liberación de NF-κB y, por tanto, su translocación al núcleo, dando lugar a la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias. Por su parte, TLR3 Y TLR4 activan una vía de señalización independiente de Myd88 en la que TRIF recluta la proteína adaptadora TRAM en el caso de TLR4. Después, se activa el factor TRAF3 que pasa la señal a TBK1 E IKKε, que activan a IRF3 e IRF7, respectivamente. Las proteínas IRF entran en el núcleo celular y promueven la transcripción de IFN de tipo I (Asma et al., 2016).

Figura 12. Resumen de los principales pasos a seguir en el protocolo de extracción y estimulación de BMDDCs.

Figura 13. Representa el esquema seguido en la estimulación de BMDDCs. Ag representa cualquier estímulo empleado que no sea ES o CE.

Figura 14. Representa las distintas asociaciones de los anticuerpos empleados. Los colores indican el tipo de fluorocromo empleado: Rojo (PE), Verde (FITC), Azul (APC).

Figura 15. A. Selección de BMDDCs totales mediante los parámetros de dispersión de luz lateral y frontal. B. Marcado de células CD11c⁺ sobre la selección de BMDDCs totales.

Figura 16. Marcado de células CD80+ (A), CD86+ (B), MHC I (C), MHC II (D), IL-10+ (E), IL-12+ (F), TNF- α + (G), Myd88 (H) y NF- κ B (I), sobre el total de CD11c+.

Figura 17. Marcado de células IL-12+ TNF- α + (A) y MHC I+ MHC II+ (B), sobre el total de CD11c+.

Figura 18. Representa las distintas asociaciones de los anticuerpos empleados. Los colores indican el tipo de fluorocromo empleado: Naranja (PerCP), Azul (APC), Rojo (PE).

Figura 19. A. Selección de linfocitos totales derivados de esplenocitos de ratón, mediante los parámetros de dispersión de luz lateral y frontal. B. Marcado de células CD4+ sobre la selección de linfocitos totales. C. Marcado de células CD8+ sobre la selección de linfocitos totales.

Figura 20. A. Marcado de células CD4+ CD25+ sobre la selección de células CD4+ totales. B. Marcado de células CD8+ CD25+ sobre la selección de células CD8+ totales.

Figura 21. A. Marcado de células CD4+ CD25+ Foxp3+ sobre la selección de células CD4+ CD25+ totales. B. Marcado de células CD4+ CD25+ IL-10+ sobre la selección de células CD4+ CD25+ totales. C. Marcado de células CD4+ CD25+ IFN- γ + sobre la selección de células CD4+ CD25+ totales. D. Marcado de células CD8+ CD25+ Foxp3+ sobre la selección de células CD8+ CD25+ totales. E. Marcado de células CD8+ CD25+ IL-10+ sobre la selección de células CD8+ CD25+ totales. F. Marcado de células CD8+ CD25+ IFN- γ + sobre la selección de células CD8+ CD25+ totales.

Figura 22. Esquema seguido en la distribución de los antígenos ensayados, así como los pocillos control y los blancos, en las placas 1, 2 y 3. C, control; ES, antígeno excretor-secretor de *Anisakis simplex*; CE, antígeno total de *A. simplex*; LPS, LPS *E. coli* 026B6; CpG, CpG (ODN1826).

Figura 23. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. A. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80+ así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue cercano a la significancia en presencia de CE respecto al control ($p=0,05$). B. Muestra la intensidad media de fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86 en la población CD11c+, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto al control ($p=0,047$).

Figura 24. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. A. Muestra el porcentaje medio de células CD11c+ MHC I+, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES y LPS *E. coli* 026B6 en combinación respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,045$). B. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de MHC I+ en las células CD11c+, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación LPS *E. coli* 026B6, con respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,025$).

Figura 25. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de MHC I+ en las células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,036$).

Figura 26. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de MHC II+ en las células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,012$).

Figura 27. Resultados en ratones BALB/c a día 6 tras 24 h de estimulación. A. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c-, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto al control ($p=0,038$). B. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto al control ($p=0,024$).

Figura 28. Resultados en ratones BALB/c a día 6 tras 24 h de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,01$, $p=0,011$, respectivamente). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,006$).

Figura 29. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,021$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,007$).

Figura 30. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,013$).

Figura 31. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,049$).

Figura 32. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,014$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la citocina IL-12 en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE respecto al control ($p=0,01$ y $p=0,01$, respectivamente).

Figura 33. Resultados en ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,032$).

Figura 34. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,039$).

Figura 35. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD86+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,006$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue cercano a la significancia en presencia de CE respecto al control ($p=0,05$).

Figura 36. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p<0,001$).

Figura 37. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha

población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$). **C.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c-, así como su desviación estándar. La reducción en la expresión de dicha molécula fue cercana a la significancia en presencia de ES respecto al control ($p=0,05$).

Figura 38. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la IL-12 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,01$).

Figura 39. Resultados en ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-10+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,034$).

Figura 40. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+, así como su desviación estándar. La población CD11c+ se vio significativamente disminuida al asociar ES con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,043$).

Figura 41. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c+, así como su desviación estándar. La expresión de CD11c se vio significativamente disminuida en presencia de ES respecto al control ($p=0,039$).

Figura 42. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,028$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80 en células CD11c+, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de ES respecto al control ($p=0,028$).

Figura 43. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD86+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,008$).

Figura 44. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC II+, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,041$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de CE junto con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,04$).

Figura 45. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,043$).

Figura 46. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la citocina IL-10 en células CD11c+, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de CE respecto a al control ($p=0,026$).

Figura 47. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺ IL-12⁺, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,035$).

Figura 48. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁻ IL-12⁺, así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,028$, $p=0,047$, respectivamente).

Figura 49. Resultados en ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la citocina IL-10 en células CD11c⁻, así como su desviación estándar. El aumento en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,046$).

Figura 50. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺, así como su desviación estándar. El descenso en la población CD11c⁺ fue estadísticamente significativo en el caso de la asociación de ES con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,009$), así como al asociar tanto ES como CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,041$ y $p=0,012$, respectivamente).

Figura 51. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c, así como su desviación estándar. La disminución en la expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de ES y CE frente al control ($p=0,008$ y $p=0,032$, respectivamente); así como al asociar ES con LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,045$), y al combinar tanto ES como CE con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) en solitario ($p=0,013$ y $p=0,039$, respectivamente).

Figura 52. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺ CD80⁺, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue cercana a la significancia en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,05$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) intracelular de la molécula de superficie CD86 en células CD11c⁺, así como su desviación estándar. La menor expresión de dicha molécula fue estadísticamente significativa en presencia de CE y LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,046$).

Figura 53. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁻ CD80⁺ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,042$).

Figura 54. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁻ CD86⁺, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,04$).

Figura 55. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁺ MHC I⁺, así como su desviación estándar. La disminución de dicha población fue estadísticamente significativa en presencia de CE y LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,014$).

Figura 56. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁻ MHC I⁺, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y LPS *E. coli* 026B6 respecto a solo LPS *E. coli* 026B6 ($p=0,049$).

Figura 57. Resultados en ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c⁻ IL-12⁺, así como su desviación estándar. El incremento de dicha

población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,044$).

Figura 58. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+, así como su desviación estándar. El incremento en la población CD11c+ fue estadísticamente significativo en presencia de solo CE respecto al control ($p=0,042$) y al asociar ES con ST-FLA respecto a solo ST-FLA ($p=0,007$). Además, el descenso en la población CD11c+ fue estadísticamente significativo al asociar ES con Pam3CSK4 respecto a solo Pam3CSK4 ($p=0,038$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula CD11c, así como su desviación estándar. La expresión de CD11c se vio significativamente disminuida en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,041$).

Figura 59. Resultados en ratones BALB/ tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80 + así como su desviación estándar. El aumento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,019$).

Figura 60. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de CD80 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,047$).

Figura 61. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86 en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de CD86 fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,015$).

Figura 62. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto Pam3CSK4 solo ($p=0,024$).

Figura 63. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES combinación con ssARN 40 respecto a ssARN 40 solo ($p=0,015$).

Figura 64. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,038$).

Figura 65. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con HKLM respecto HKLM solo ($p=0,035$).

Figura 66. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,035$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,024$).

Figura 67. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como

su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,03$).

Figura 68. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I- MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE solo respecto al control ($p=0,029$).

Figura 69. Resultados en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II- así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,014$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II-, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,029$).

Figura 70. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II- así como su desviación estándar, en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,013$).

Figura 71. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-10+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,022$).

Figura 72. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-10 en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de IL-10 fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) respecto Poly (I:C) solo ($p=0,032$).

Figura 73. Resultado en ratones BALB/c tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,026$).

Figura 74. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con PAM3CSK4 respecto a PAM3CSK4 solo ($p=0,039$).

Figura 75. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c- así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ssARN 40 respecto ssARN 40 solo ($p=0,045$).

Figura 76. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,045$).

Figura 77. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- TNF- α +, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con PAM3CSK4 respecto a PAM3CSK4 solo ($p=0,046$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Pam3CSK4 respecto Pam3CSK4 solo ($p=0,015$).

Figura 78. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c- así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo tanto en presencia de ES como de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,042$, $p=0,01$, respectivamente).

Figura 79. Resultado en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12+ TNF- α así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con PAM3CSK4 respecto a PAM3CSK4 solo ($p=0,006$).

Figura 80. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo tanto en presencia de ES como de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,028$, $p=0,004$, respectivamente).

Figura 81. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12- TNF- α así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,049$). **B.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ IL-12- TNF- α así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,013$).

Figura 82. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c+ IL-12+ TNF- α así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo tanto en presencia de ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto CpG (ODN1826) solo ($p=0,028$).

Figura 83. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES solo respecto al control ($p=0,012$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de ES solo respecto al control ($p=0,006$).

Figura 84. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con ssARN 40 respecto a solo ssARN 40 ($p=0,049$, $p=0,02$, respectivamente). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo al asociar CE con ssARN 40 ($p=0,004$), y cercano a la significancia al combinar ssARN 40 con ES respecto a ssARN 40 en solitario ($p=0,05$).

Figura 85. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- Myd88+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,009$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de solo ES respecto al control ($p=0,048$).

Figura 86. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c-, así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a solo LPS *E. coli* K12 ($p=0,019$, $p=0,031$, respectivamente).

Figura 87. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ NF- κ B+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue

estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p=0,037$).

Figura 88. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción NF- κ B en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de NF- κ B fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,036$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción NF- κ B en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de NF- κ B fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,025$).

Figura 89. Resultados en ratones BALB/c tras 12 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- NF- κ B +, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,002$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción NF- κ B en células CD11c-, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de NF- κ B fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con FSL-1 respecto a solo FSL-1 ($p=0,034$).

Figura 90. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c +, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,001$), y en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,002$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD11c+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de CD11c fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,038$).

Figura 91. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ CD80+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,043$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80+ en células CD11c+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de CD80 fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,04$).

Figura 92. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD80+ en células CD11c+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de CD80 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,019$).

Figura 93. Resultados en ratones C57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie CD86+ en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de CD86 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,013$).

Figura 94. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,042$).

Figura 95. Resultado en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+, así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,008$).

Figura 96. Resultado en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC I+ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue

estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,015$).

Figura 97. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p=0,036$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p=0,045$).

Figura 98. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,046$ y $p=0,037$, respectivamente).

Figura 99. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a solo Pam3CSK4 ($p=0,028$ y $p=0,028$, respectivamente).

Figura 100. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ MHC I+ MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con HKLM respecto a HKLM solo ($p=0,014$).

Figura 101. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC II+, así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p=0,045$).

Figura 102. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+ MHC I+ MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,034$, $p=0,024$, respectivamente).

Figura 103. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC II en células CD11c+ MHC I- MHC II+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de MHC II fue estadísticamente significativo en presencia de ES respecto al control ($p=0,041$).

Figura 104. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la molécula de superficie MHC I en células CD11c+ MHC I+ MHC I+ así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de MHC I fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,032$).

Figura 105. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. **A.** Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- IL-12+, así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue cercano a la significancia en presencia de ES en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,05$). **B.** Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina IL-12 en células CD11c- IL-12+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de IL-12 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con ST-FLA respecto a ST-FLA solo ($p=0,005$).

Figura 106. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ TNF- α así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue

estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p=0,021$).

Figura 107. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) de la citocina TNF- α en células CD11c+ TNF- α + así como su desviación estándar. El incremento en la expresión de TNF- α fue estadísticamente significativo en presencia de ES en combinación con Poly (I:C) LMW respecto a Poly (I:C) LMW solo ($p=0,034$).

Figura 108. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c- TNF- α + así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con Pam3CSK4 respecto a Pam3CSK4 solo ($p=0,045$).

Figura 109. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El incremento de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de ES y CE en combinación con LPS *E. coli* K12 respecto a LPS *E. coli* K12 solo ($p=0,023$, $p=0,018$, respectivamente).

Figura 110. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean) del factor de transcripción Myd88 en células CD11c+ Myd88+ así como su desviación estándar. El descenso en la expresión de Myd88 fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,035$).

Figura 111. Resultados en ratones CD57BL/6 tras 24 horas de estimulación. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD11c+ NF- κ B+ así como su desviación estándar. El descenso de dicha población fue estadísticamente significativo en presencia de CE en combinación con CpG (ODN1826) respecto a CpG (ODN1826) solo ($p=0,033$).

Figura 112. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación.

Figura 113. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 114. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 115. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 116. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 117. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo, tanto para ES como para CE en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p<0,0001$ y $p<0,0001$, respectivamente).

Figura 118. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la

concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para CE en combinación con Poly (I:C) respecto a Poly (I:C) solo ($p<0,0001$).

Figura 119. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 120. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 121. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para CE en combinación con ST-FLA respecto a solo ST-FLA ($p<0,05$).

Figura 122. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo tanto para ES como para CE en combinación con HKLM respecto a solo HKLM ($p<0,0001$ y $p<0,0001$, respectivamente).

Figura 123. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 124. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación.

Figura 125. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 126. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para ES en combinación con LPS *E. coli* 026B6 respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo ($p<0,0001$).

Figura 127. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. El descenso en la concentración media de IL-10 fue estadísticamente significativo para ES en combinación con CpG (ODN1826) respecto a solo CpG (ODN1826) ($p<0,0001$).

Figura 128. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 129. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 130. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 131. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 132. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 133. Resultados en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 134. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 135. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* 026B6 + ES y LPS *E. coli* 026B6 + CE en ratones C57BL/6 fue significativamente superior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p < 0,0001$ en todos los casos).

Figura 136. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de CpG (ODN1826), CpG (ODN1826)+ES y CpG (ODN1826)+CE en ratones C57BL/6 fue significativamente superior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p < 0,05$ en todos los casos).

Figura 137. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 138. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de HKLM solo en ratones C57BL/6 fue significativamente inferior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p < 0,0001$).

Figura 139. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml) así como su desviación estándar en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. La concentración media de IL-10 producida en presencia de Poly (I:C) + CE en ratones C57BL/6 fue significativamente inferior a la producida en los ratones BALB/c en las mismas condiciones ($p < 0,001$).

Figura 140. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 141. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. El aumento en la concentración media de IL-10 para LPS *E. coli* K12, LPS *E. coli* K12+ES y LPS *E. coli* K12+CE en ratones C57BL/6 fue estadísticamente significativo respecto a LPS *E. coli* 026B6, LPS *E. coli* 026B6+ES y LPS *E. coli* 026B6+CE, respectivamente, en ratones BALB/c ($p < 0,0001$ en todos los casos).

Figura 142. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6 tras 48 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 143. Muestra el porcentaje medio (%) de células CD4 de ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. El descenso en la población CD4 fue estadísticamente significativo en presencia de BMDDCs, previamente estimuladas con ES solo respecto al control ($p = 0,0273$).

Figura 144. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de **A.** Células CD4+ CD25+. **B.** Células CD4+ CD25-. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 145. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 146. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 147. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8 de ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 148. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8+ de ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. **A.** Células CD8+ CD25+. **B.** Células CD8+ CD25-. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 149. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 150. Resultados ratones BALB/c tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 151. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD4+ de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 152. Resultados de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25+. **B.** Células CD4+ CD25-. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 153. Resultados de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 154. Resultados de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD4+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD4+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD4+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 155. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8+ de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 156. Muestra el porcentaje medio (%) y desviación estándar de células CD8+ de ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. **A.** Células CD8+ CD25+. El incremento en la población CD8+ CD25+ fue estadísticamente significativo en presencia de BMDDCs previamente estimuladas con CE solo respecto al control negativo ($p=0,0112$). **B.** Células CD8+ CD25-. El incremento en la población CD8+ CD25- fue estadísticamente significativo en presencia de BMDDCs previamente estimuladas con CE solo respecto al control negativo ($p=0,0112$).

Figura 157. Resultados ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25+ IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25+ Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25+ IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 158. Resultados ratones C57BL/6 tras 48 horas de incubación. Muestran el porcentaje medio (%) y desviación estándar de: **A.** Células CD8+ CD25- IL-10+. **B.** Células CD8+ CD25- Foxp3+. **C.** Células CD8+ CD25- IFN- γ +. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Figura 159. Resultados de las curvas de crecimiento de los esplenocitos en presencia de tres concentraciones distintas del colorante redox y estimulados con LPS *E. coli* 026B6. Se representa gráficamente el incremento, en tanto por cien, de la intensidad de fluorescencia de los esplenocitos estimulados con LPS *E. coli* 026B6 respecto al control [(F LPS *E. coli* 026B6X100/F Control)-100], registrado para las distintas concentraciones de resazurina ensayadas, tras 51 h de incubación desde el inicio de la estimulación y tras 3 h de la adición de la resazurina a 37 °C. En la Tabla se incluyen los datos numéricos obtenidos, así como la constante de regresión R. Los resultados se han obtenido a partir de dos experimentos independientes.

Figura 160. Resultados obtenidos tras la incubación con resazurina (1 mM) de concentraciones crecientes de esplenocitos a distintos tiempos (de 1 h a 18 h). La Gráfica representa el incremento en tanto por cien de la fluorescencia registrada de los esplenocitos estimulados con LPS *E. coli* 026B6 respecto al control, a los distintos tiempos. En la Tabla se resumen los parámetros obtenidos para cada curva de crecimiento. Los resultados se han obtenido a partir de dos experimentos independientes.

Figura 161. Muestra la Intensidad de Fluorescencia media y su desviación estándar para cada uno de los tiempos ensayados, en función de los estímulos empleados en cada caso, en ratones BALB/c. ES, antígeno secretor-excretor de *Anisakis simplex*; CE, antígeno total de *A. sinmplex*.

Figura 162. Muestra la Intensidad de Fluorescencia media y su desviación estándar para cada uno de los tiempos ensayados, en función de los estímulos empleados en cada caso, en ratones C57BL/6. ES, antígeno secretor-excretor de *Anisakis simplex*; CE, antígeno total de *A. simplex*.

Figura. 163. Muestra la frecuencia de los distintos subtipos de linfocitos T en función de las inmunoglobulinas anti- *Anisakis simplex*: IgS, IgA e IgM positivas (P) y negativas (N), así como su significancia estadística. Los valores de células T están expresados en células/mm³. Valor *p*, Test de U de Mann-Whitney.

Figura 164. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en función de la severidad del cuadro séptico (**panel A, B y C**), y el grado de positividad (%) de IgG anti-*A. simplex* (**panel D**). Control (n=97), Sepsis (n=40), Sepsis Severa (n=50), Shock séptico (n=24). **Panel A:** Para IgS anti-*Anisakis* totales, se hallaron diferencias significativas entre los grupos control-sepsis y sepsis severa, *p*=0,001; el grupo de sepsis y el grupo de shock séptico, *p*<0,0001. Para IgM anti-*A. simplex*, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control-sepsis y el grupo de sepsis severa, *p*=0,016; el grupo control-sepsis y el grupo de shock séptico, *p*=0,002. Para IgA, se determinaron diferencias significativas entre el grupo control-sepsis y el grupo de sepsis severa, *p*=0,004; el grupo de control-sepsis y el grupo de shock séptico, *p*<0,0001. **Panel B:** Para IgE, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de shock séptico y otros, *p*=0,003. **Panel C:** Para IgG, se determinaron diferencias significativas entre los grupos de shock séptico y otros, *p*=0,038.

Figura 165. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgA anti-*Anisakis simplex* con células T $\gamma\delta$ y el tiempo previo a la admisión, así como los índices APACHE y SOFA en pacientes sépticos.

Figura 166. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-*Anisakis simplex* con los correspondientes biomarcadores e índices de gravedad en pacientes sépticos.

Figura 167. Muestra la deficiencia en células T $\alpha\beta$ (A) y $\gamma\delta$ (B), de acuerdo con la severidad del cuadro séptico (%). Control (N=97), Sepsis (N=40), Sepsis Severa (N=50), Shock Séptico (N=24). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y total de todos los pacientes sépticos (*p*<0.001), así como entre el grupo de sepsis no complicada y sepsis severa/shock séptico (*p*< 0.05), con la excepción de las células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ CD3+CD56+.

Figura 168. Panel A: LT $\gamma\delta$ de sangre periférica en relación con el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección/sepsis y su admisión en el servicio de Urgencias/Unidad de Cuidados Intensivos (todos los

pacientes sépticos). Los valores están expresados a modo de media (células/mm³), y T bars denota 95% confidence intervals. El número de pacientes por grupo fue el siguiente: 1 día, n=43; 2 días, n=27; 3 días, n=16; y tres o cuatro días, n=28. Para células CD3+ T $\gamma\delta$, se encontraron diferencias significativas entre los días 1-3 (p=0,050), 1-4 (0,008); Para células CD3+CD8+ T $\gamma\delta$, entre los días 1-2 y 3 (p=0,035), 1-2 y 4 (0,042); Para células CD3+CD56+, se determinaron diferencias significativas entre los días 1 y 4 (p=0,045). **Panel B: Niveles de Ig A anti-Anisakis simplex** en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de la infección/sepsis y la admisión en el servicio de Urgencias/Unidad de Cuidados Intensivos. Diferencias entre el día 1-2 y 4 (p=0,003). **Panel C: Niveles de IgG anti-A. simplex** respecto a los hemocultivos (p< 0,001). **Panel D: Niveles de IgA anti-A. simplex** en relación a la tinción Gram (p=0,016). Los valores de los niveles de las inmunoglobulinas están expresados a modo de medias (D.O.) y el intervalo de confianza fue 95%. Valor P: Test U de Mann-Whitney.

Figura 169. Esquema en el que se relaciona la respuesta inmunitaria del hospedador frente al helminto parásito. Se señalan en azul los mecanismos característicos inducidos por el hospedador (morado), o por el helminto (verde), que dan lugar a un cuadro específico (rojo). (Nutman T.B., 2015).

Figura 170. Modificación significativa del efecto de los agonistas de los TLR ensayados por ES de *Anisakis simplex* en BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6.

Figura 171. Modificación significativa del efecto de los agonistas de los TLR ensayados por CE de *Anisakis simplex* en BMDDCs de ratones BALB/c y C57BL/6.

Figura 172. La estimulación de BMDDCs con los productos larvarios de *Anisakis simplex* origina, por un lado, CDs tolerogénicas productoras de IL-10 y, por otro, CDs de tipo Th1 productoras de IL-12 y/o TNF- α . En los ratones BALB/c, se estaría desarrollando una respuesta inflamatoria aguda con menor producción de IL-10 y mayor de IL-12 en comparación con la cepa C57BL/6. Así, las CDs tolerogénicas productoras de IL-10 inducirán linfocitos T reguladores productores de IL-10 que, a su vez, inhibirán a los linfocitos T productores de IFN- γ , inducidos por las CDs de carácter inflamatorio. De este modo los productos larvarios de *A. simplex* son capaces de inmunomodular la respuesta inmunitaria

XI. LISTADO DE TABLAS

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Subfamilia Anisakinae (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009)

Tabla 2. Prevalencia de larvas de *Anisakis simplex* en pescados de diferentes áreas (EFSA, 2010).

Tabla 3. Diferentes tratamientos sobre las larvas de *Anisakis* en los pescados (EFSA, 2010).

Tabla 4. Alérgenos caracterizados de *Anisakis simplex*.

Tabla 5. TLR: ligandos y producción de citocinas.

Tabla 6. Preparación de la curva patrón para el método de Bradford.

Tabla 7. Diseño esquemático de los tiempos de estimulación para cada uno de los marcadores estudiados.

Tabla 8. Muestra los marcadores estudiados por CMF en linfocitos de ratón.

Tabla 9. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar, de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones a día 6 de maduración. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10. Se muestra la media en porcentaje (%) e intensidad media de fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 11. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 12. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (Gmean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 13. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Además, la expresión de MHC I y MHC II en dichas poblaciones queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 14. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como la desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 15. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 16. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), y su desviación estándar, de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones a día 9 de maduración. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 17. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 18. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 19. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 20. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 21. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 22. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 23. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones en ratones CD57BL/6 a día 6 de maduración. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 24. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 25. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 26. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 27. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 28. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en

BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Además, la expresión de IL-10 y IL-12 en dichas poblaciones queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en **negrita** corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 29. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 6 de maduración tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 30. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones a día 9 de maduración. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 31. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ CD80+ y CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 32. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- CD80+ y CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración, tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 33. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ MHC I+ y CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 34. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- MHC I+ y CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 35. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c+ IL-10+ y CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 36. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de las dos poblaciones estudiadas: CD11c- IL-10+ y CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 a día 9 de maduración tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 37. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones BALB/c. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 38. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ CD80+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Además, la expresión de CD80 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 39. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- CD80+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 40. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 41. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- CD86+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 42. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 43. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- MHC I+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 44. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 45. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 46. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I+ MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 47. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I- MHC II+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 48. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ MHC I+ MHC II- en BMDDCs de ratones BALB/c tras 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 49. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-10+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 50. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- IL-10+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 51. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 52. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h y 24 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 53. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 54. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 55. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 56. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12- TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 57. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ TNF- α en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 58. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ Myd88+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 59. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- Myd88+ en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 60. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c+ NF- κ B + en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 61. Se muestra la media en porcentaje (%) y la Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de la población CD11c- NF- κ B + en BMDDCs de ratones BALB/c tras 12 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 62. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 63. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ CD80+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 64. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c- CD80+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones, tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 65. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ CD86+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 66. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c- CD86+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 67. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC I+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 68. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c- MHC I+, obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 69. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 70 Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar, de células CD11c- MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 71. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar, de células CD11c+ MHC I+ MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 72. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC I- MHC II+ obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 73. Se muestra la media en porcentaje (%) e Intensidad Media de Fluorescencia (GMean), así como su desviación estándar de células CD11c+ MHC I+ MHC II- obtenidas en presencia de cada uno de los antígenos y cada una de sus combinaciones tras 24 h de estimulación en ratones C57BL/6. Los valores en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 74. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ IL-10+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-10 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 75. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- IL-10+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-10 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 76. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-12 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 77. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- IL-12+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de IL-12 en dicha población

queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 78. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c TNF- α + en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de TNF- α en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 79. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- TNF- α + en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de TNF- α en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 80. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ Myd88+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de Myd88 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 81. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- Myd88+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de Myd88 en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 82. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c+ NF- κ B+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de NF- κ B en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 83. Se muestra la media en porcentaje (%) y la desviación estándar de la población CD11c- NF- κ B+ en BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 12 h de estimulación. Además, la expresión de NF- κ B en dicha población queda reflejada por la intensidad media de fluorescencia (GMean) junto con la desviación estándar correspondiente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 84. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones BALB/c tras 48 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 85. Se muestra la concentración media de IL-10 (pg/ml), así como su desviación estándar, en los sobrenadantes de BMDDCs de ratones C57BL/6 tras 48 h de estimulación. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 86. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de linfocitos CD4+ obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 87. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de células CD4+ CD25+ y CD4+ CD25- obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 88. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de las poblaciones CD4+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ + y CD4+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 89. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ + y CD4+ CD25- Foxp3 +, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 90. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de células CD8, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 91. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 92. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD8+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IFN- γ + y CD8+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 93. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD8+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IFN- γ + y CD8+ CD25- Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones BALB/c. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 94. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de células CD4+ obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 95. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de linfocitos CD4+ CD25+ y CD4+ CD25-, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 96. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD4+ CD25+ IL-10+, CD4+ CD25+ IFN- γ + y CD4+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 97. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de las poblaciones CD4+ CD25- IL-10+, CD4+ CD25- IFN- γ + y CD4+ CD25- Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 98. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de células CD8+ obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 99. Se muestra la media en porcentaje (%) así como su desviación estándar de células CD8+ CD25+ y CD8+ CD25-, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. Los valores en rojo se corresponden con diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 100. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de las poblaciones CD8+ CD25+ IL-10+, CD8+ CD25+ IFN- γ + y CD8+ CD25+ Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 101. Se muestra la media en porcentaje (%), así como su desviación estándar, de las poblaciones CD8+ CD25- IL-10+, CD8+ CD25- IFN- γ + y CD8+ CD25- Foxp3+, obtenidos bajo las condiciones previamente descritas de ratones C57BL/6. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 202. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 1 en ratones BALB/c.. Los datos cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 103. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 1 en ratones BALB/c.. Los datos cada punto son su media \pm

desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 104. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 1 en ratones BALB/c. Los valores de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los datos en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 105. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 2 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 106. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 2 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 107. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 2 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 108. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 3 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 109. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 3 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 110. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 3 en ratones BALB/c. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 111. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 1 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 112. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 1 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 113. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 1 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 114. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 2 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación

estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 115. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 2 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 116. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 2 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 117. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de ES o CE, respecto al control sin estimular a Día 3 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 118. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de LPS *E. coli* 026B6 junto con ES o CE, respecto a LPS *E. coli* 026B6 solo, a Día 3 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Tabla 119. Resultados de las curvas de crecimiento de esplenocitos en presencia de CpG (ODN1826) con ES o CE, respecto a CpG (ODN1826) solo, a Día 3 en ratones C57BL/6. Los datos de cada punto son su media \pm desviación estándar de un experimento realizado por cuadruplicado. Los valores en rojo corresponden a diferencias estadísticamente significativas respecto a CpG (ODN1826) solo para cada tiempo correspondiente.

Tabla 120. Niveles de anticuerpos anti-Anisakis *simplex* en función del género en individuos sanos. Los resultados están expresados en Absorbancias (490 nm). Para poder comparar cada uno de los isotipos, se calcularon los logaritmos de las Absorbancias tras multiplicarlos por 10 (IgS, IgG, IgM y IgA; dilución 1/100) o por 500 (IgE; dilución 1/2). IgS: inmunoglobulinas totales. N.S.: no significativo. Media \pm desviación estándar. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 121. Niveles de anticuerpos anti-Anisakis *simplex* en función de los grupos de edad. 15–35 años (N = 23), 36–55 (N = 28), 56–75 (N = 46), 76–95 (N = 35). Los resultados están expresados en Absorbancias (490 nm). Para poder comparar cada uno de los isotipos, se calcularon los logaritmos de las Absorbancias tras multiplicarlos por 10 (IgS, IgG, IgM e IgA; dilución 1/100) o por 500 (IgE; dilución 1/2). IgS: inmunoglobulinas totales. N.S.: no significativo. Media \pm desviación estándar. Los datos en rojo corresponden a valores estadísticamente significativos.

Tabla 122. Correlaciones entre células NKT y linfocitos B, con los niveles de anticuerpos anti-Anisakis *simplex*. Se empleó el Test de la rho de Spearman. IgS: inmunoglobulinas totales.

Tabla 123. Frecuencia de linfocitos B CD19+ en función de los anticuerpos anti-A. *simplex* positivos y negativos. Los linfocitos B están expresadas en células/mm³. Media \pm Desviación estándar. Test de U de Mann-Whitney. IgS: inmunoglobulinas totales.

Tabla 124. Características de los pacientes con sepsis. N=114. *al menos un paciente con alguno de los siguientes diagnósticos: abscesos, celulitis, enfermedad pélvica inflamatoria, gangrena, malaria, isquemia intestinal, obstrucción intestinal, pancreatitis aguda, peritonitis primaria o artritis séptica. D.E.: Desviación estándar.

Tabla 125. Valores e intervalos de referencia normales para cada uno de los subtipos de células T/mm³.

Tabla 126. Diferencias entre los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis simplex* en relación a la presencia de déficit o no de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ T en todos los pacientes sépticos.

Tabla 127. Relación entre la mortalidad y el déficit de en los subtipos de linfocitos T

XII. ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Dot-Blots en los que se muestra el porcentaje de células CD11c⁺ IL-12⁺ a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación, en función de los antígenos empleados respecto al control. **A.** Ratones BALB/c. **B.** Ratones C57BL/6.

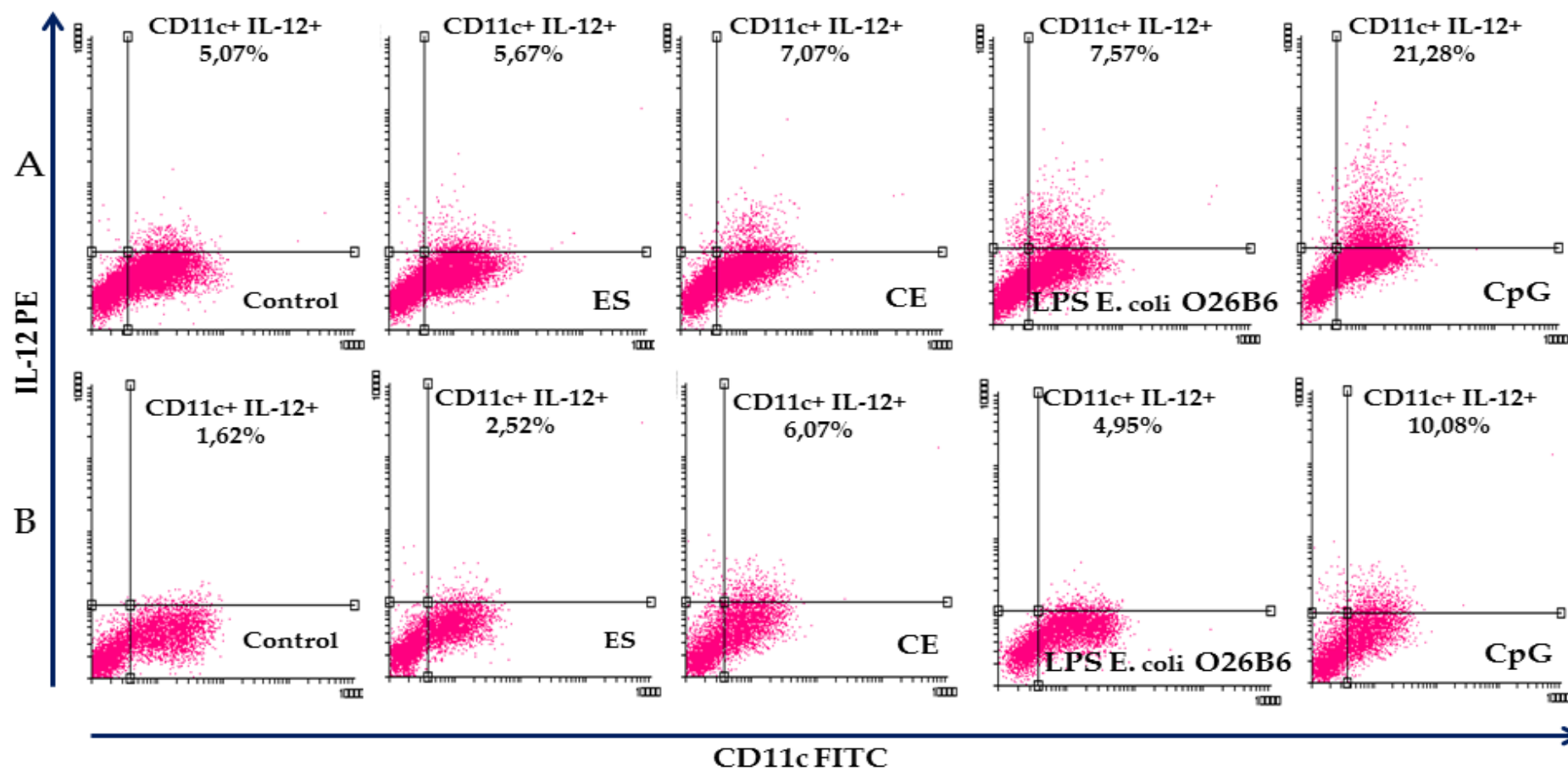
Anexo 2. Dot-Blots en los que se muestra el porcentaje de las poblaciones CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ y CD4⁺ CD25⁺ IL10⁺ tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control. Estos resultados corresponden a la cepa de ratón BALB/c.

Anexo 3. Dot-Blots en los que se muestra el porcentaje de las poblaciones CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ y CD8⁺ CD25⁺ IL10⁺ tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control. Estos resultados corresponden a la cepa de ratón BALB/c.

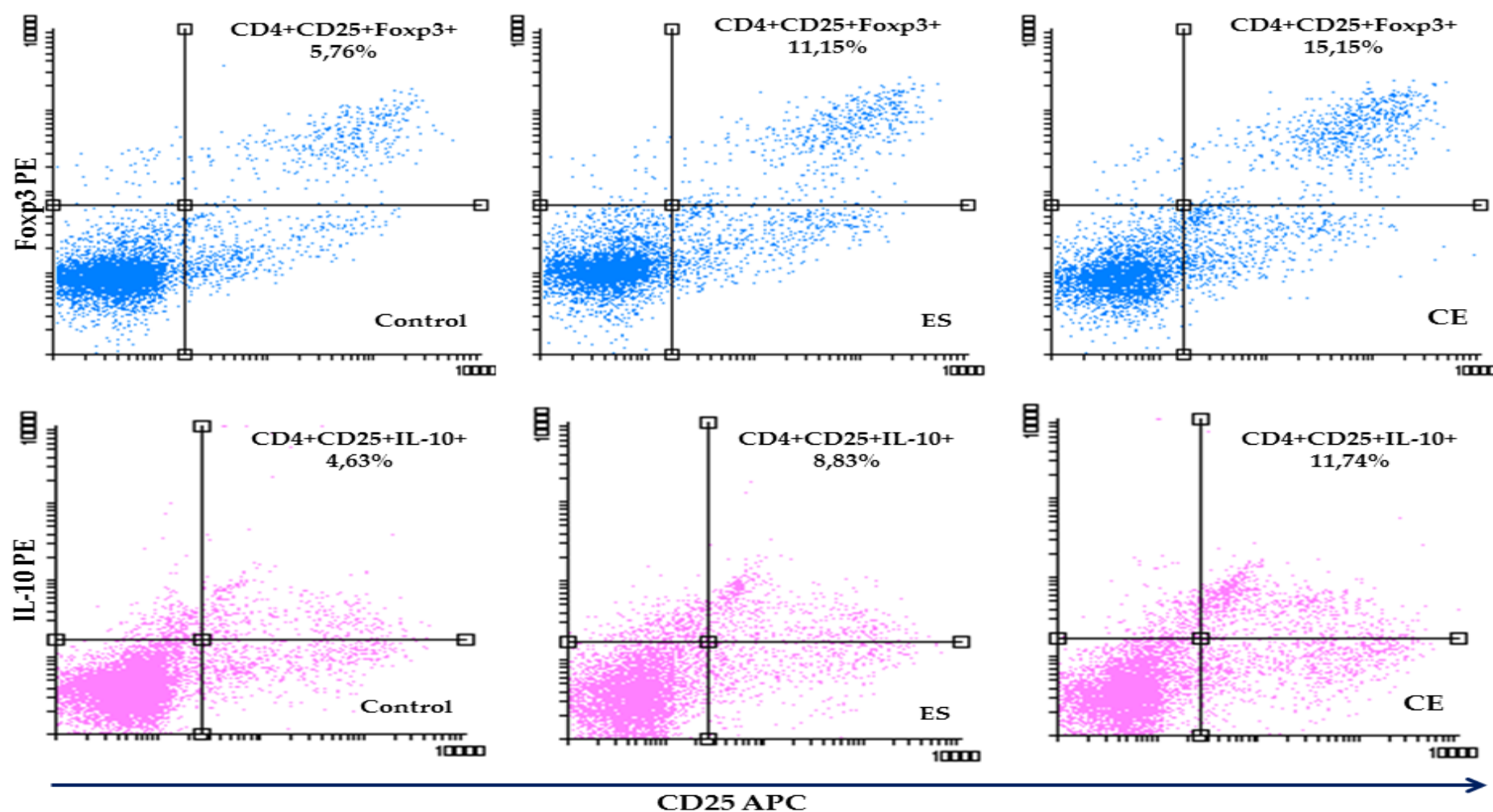
Anexo 4. Dot-Blots en los que se muestra el porcentaje de las poblaciones CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ y CD8⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control. Estos resultados corresponden a la cepa de ratón C57BL/6.

Anexo 5. Dot-Blots en los que se muestra, tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control: **A.** El porcentaje de la población CD4⁺ CD25⁺ IFN- γ ⁺ y **B.** El porcentaje de la población CD4⁺ CD25⁻ IFN- γ ⁺.

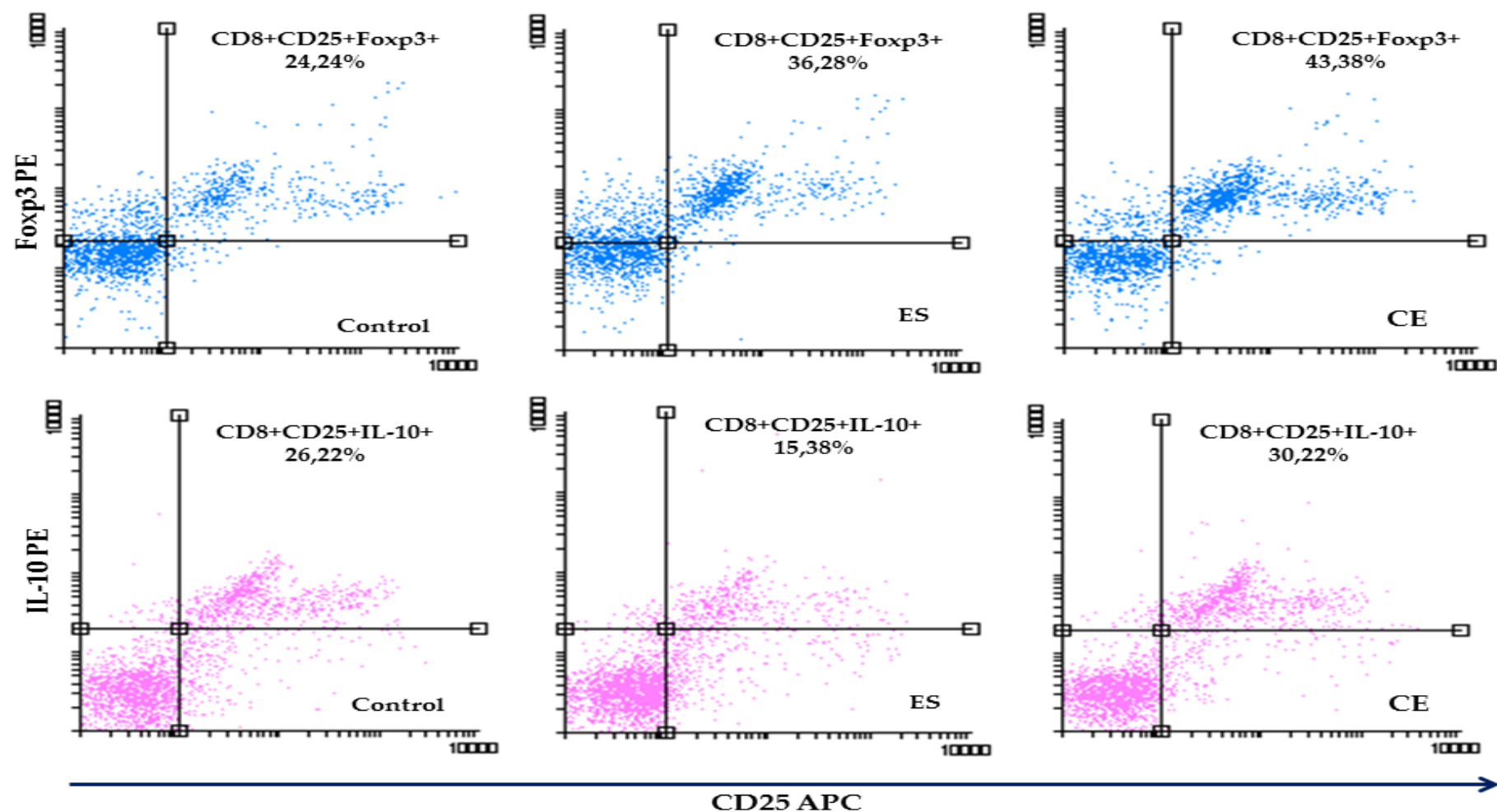
ANEXOS



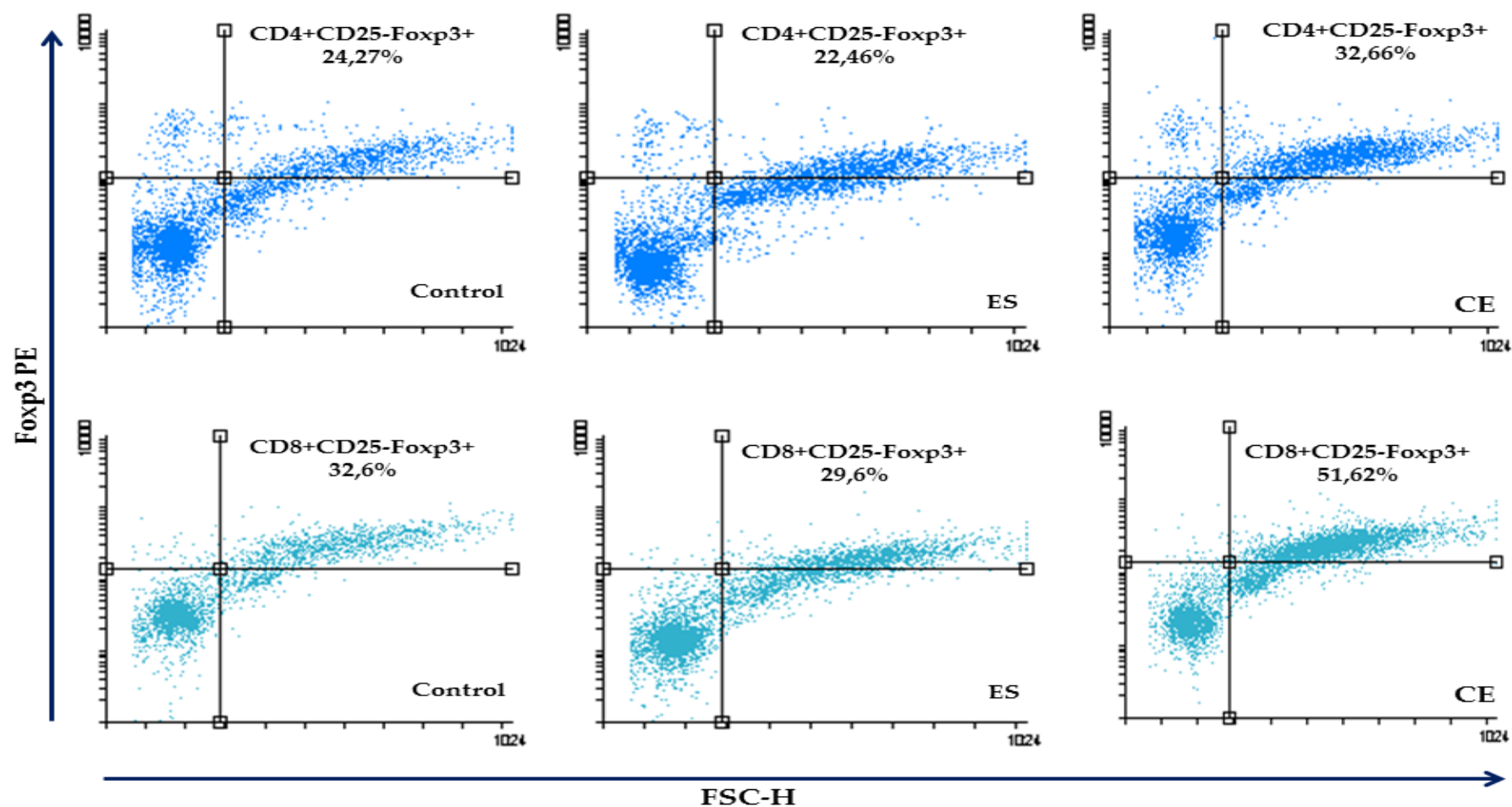
Anexo 1. Dot-Plots en los que se muestra el porcentaje de células CD11c+ IL-12+ a día 6 de maduración y tras 24 h de estimulación, en función de los antígenos empleados respecto al control. **A.** Ratones BALB/c. **B.** Ratones C57BL/6.



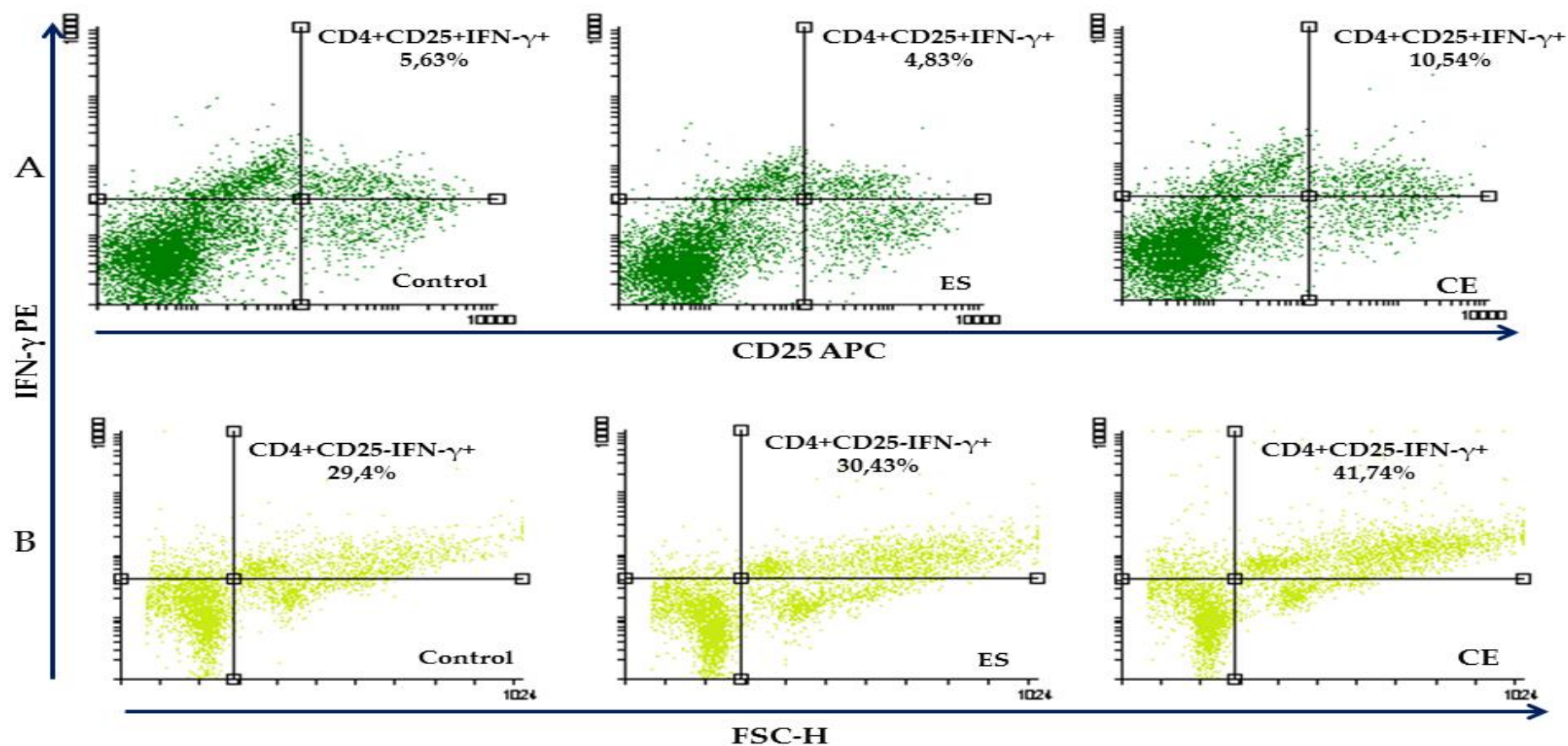
Anexo 2. Dot-Plots en los que se muestra el porcentaje de las poblaciones CD4+ CD25+ Foxp3+ y CD4+ CD25+ IL10+ tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control. Estos resultados corresponden a la cepa de ratón BALB/c.



Anexo 3. Dot-Plots en los que se muestra el porcentaje de las poblaciones CD8+ CD25+ Foxp3+ y CD8+ CD25+ IL10+ tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control. Estos resultados corresponden a la cepa de ratón BALB/c.



Anexo 4. Dot-Plots en los que se muestra el porcentaje de las poblaciones CD4+ CD25- Foxp3+ y CD8+ CD25- Foxp3+ tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control. Estos resultados corresponden a la cepa de ratón C57BL/6.



Anexo 5. Dot-Plots en los que se muestra, tras cocultivar esplenocitos de ratón vírgenes con BMDDCs previamente estimuladas con ES o CE respecto al control: **A.** El porcentaje de la población CD4+ CD25+ IFN-γ+ y **B.** El porcentaje de la población CD4+ CD25- IFN-γ+.